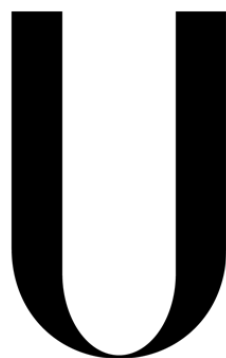


Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Aplicação clínica de células mesenquimatosas em cirurgia oral
uma revisão sistemática da literatura**

Teresa Margarida Ripado Valério

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2016

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Aplicação clínica de células mesenquimatosas em
cirurgia oral uma revisão sistemática da literatura**

Teresa Margarida Ripado Valério

Dissertação orientada pela
Professora Doutora Helena Francisco
Professora Doutora Manuela Lopes

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2016

Para a minha irmã.

AGRADECIMENTOS

À Professora Helena Francisco, por toda a disponibilidade, compreensão e atenção. Nunca poderei agradecer o suficiente por ter aceite este desafio e ter permitido que chegasse até aqui.

À Professora Manuela Lopes, antes de tudo, pela amizade e preocupação ao longo destes 5 anos. Por toda a força e motivação que me ajudou a não desistir. Por ter acreditado em mim desde o início.

À minha irmã, por existir e continuar a deixar-me sonhar que um dia posso vir a ser como ela.

GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

<i>ASCs</i>	<i>adult stem cells</i> células estaminais adultas
<i>BMSCs</i>	<i>bone marrow stem cells</i> células estaminais da medula óssea
<i>DMO</i>	densidade mineral óssea
<i>EPS</i>	elevação do pavimento do seio
<i>ESCs</i>	<i>embryonic stem cells</i> células estaminais embrionárias
<i>FVO</i>	fração de volume ósseo
<i>MSCs</i>	<i>mesenchymal stem cells</i> células estaminais mesenquimatosas
<i>PA</i>	preservação do alvéolo
<i>RCT</i>	<i>randomized clinical trial</i> ensaio clínico controlado e aleatorizado
<i>ROG</i>	regeneração óssea guiada
<i>TEB</i>	<i>tissue-engineered bone precursors</i> percursores de tecidos ósseos

RESUMO

Introdução: A capacidade das BMSCs se diferenciarem em células osteoblásticas e formarem osso tem sido extensivamente investigada. O princípio fundamental da terapia *in vivo* utilizando BMSCs em engenharia óssea defende que as células indiferenciadas após migrarem para o local da lesão, irão, sob a influência de sinais locais, sofrer diferenciação em células com o fenótipo apropriado para a reparação do tecido lesado. Apesar de existirem fontes celulares alternativas, as BMSCs continuam a ser o tipo celular primordial a utilizar em engenharia óssea.

Objetivo: Pretende-se responder à questão PICO: “Em pacientes adultos com deficiências ósseas alveolares a utilização de BMSCs para regeneração alveolar é mais eficaz quando comparada com outras terapias com base na utilização de enxertos ósseos autógenos e outros tipos de células estaminais a nível da localização do defeito ósseo; volume, altura e densidade óssea; sucesso da terapia implantar/ necessidade de transplante ósseo adicional; e evidência de regeneração de novo tecido ósseo?”

Materiais e Métodos: Foi efetuada uma pesquisa na base de dados primária (*MEDLINE*) com as palavras-chave *mesenchymal stem cells* e *regenerative oral medicine* para estudos humanos, sem restrições temporais, nas línguas portuguesa, espanhola e inglesa. Dos 217 estudos foram incluídos 4, duas revisões sistemáticas, 1 estudo coorte e 1 RCT.

Resultados: Num total de 419 pacientes foram avaliados os seguintes parâmetros: localização do defeito ósseo; técnica regenerativa utilizada; volume, altura e densidade óssea; sucesso da terapia implantar/ necessidade de transplante ósseo adicional e evidência de regeneração de tecido ósseo. Os resultados foram superiores nas terapias com base na utilização de células estaminais da medula óssea.

Conclusões: A eficácia relatada nos estudos de engenharia tecidual continua a ser controversa e uma pesquisa mais aprofundada é necessária antes de poder implementar de forma segura este tipo de terapias regenerativas na prática clínica.

Palavras-chave: células estaminais; regeneração óssea; medula óssea.

ABSTRACT

Introduction: The ability of BMSCs to differentiate into osteoblastic cells and generate bone has been extensively investigated. The principle of in vivo therapy based on the use of BMSCs in bone engineering defends that the undifferentiated cells after migrating to the injury site will, under the influence of local signals, differentiate into cells having the appropriate phenotype for repair the damaged tissue. Although there are alternative cell sources, BMSCs remain the primary cell type to be used in bone engineering.

Purpose: The aim was to answer the PICO question: "In adult patients with alveolar bone deficiencies the use of BMSCs to cellular regeneration is more effective when compared with other therapies based on the use of autogenous bone grafts and other types of stem cells taking into account the bone defect location; volume, height and bone density; success from the implant therapy/ need for additional bone grafting and evidence of new bone tissue regeneration? "

Materials and Methods: Scientific search was performed in a primary database using the keywords *mesenchymal stem cells* and *regenerative oral medicine* for studies in humans, without time restrictions, written in Portuguese, Spanish or English. A total of 217 records were identified, only 4 were included (two systematic reviews, 1 cohort study and 1 RCT).

Results: 419 patients were evaluated taking into account the follow parameters: location of the bone defect; regenerative technique; volume, height and bone density; success from the implant therapy/need for additional bone grafting; and bone regeneration evidence. The results were higher in the therapies based on the use of stem cells from bone marrow.

Conclusions: The efficacy reported in studies of tissue engineering remains controversial and further research is needed before this type of regenerative therapies can be safely implement in the clinical practice.

Key-words: stem cells; bone regeneration; bone marrow.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Células estaminais embrionárias	2
1.2. Células estaminais adultas	2
1.2.1. Células estaminais hematopoiéticas	4
1.2.2. Células estaminais mesenquimatosas	4
1.2.2.1. Células estaminais mesenquimatosas derivadas de medula óssea	6
1.3. Engenharia óssea: estratégias e técnicas	7
2. Objetivo	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Critérios de seleção de estudos	13
3.1.1. Critérios de inclusão	13
3.1.2. Critérios de exclusão	13
3.2. Estratégia de busca e identificação dos estudos	14
3.3. Recolha e análise dos dados	14
4. Resultados	16
4.1. População e intervenção	17
4.1.1. Localização do defeito ósseo	18
4.1.2. Técnica regenerativa utilizada	18
4.1.3. Volume, altura e densidade óssea	19
4.1.4. Sucesso da terapia implantar/ necessidade de transplante ósseo adicional	20
4.1.5. Evidência de regeneração de tecido ósseo	20
5. Discussão	22
6. Conclusão	27
Referências Bibliográficas	XV
Anexos	XVIII
Anexo A	XIX
Anexo B	XXII
Anexo C	XXVII
Anexo D	XXXIV
Anexo E	XL

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento embrionário e fetal, a manutenção da homeostasia dos órgãos e a resposta do organismo a lesões, são controlados por vários tipos de populações de células estaminais (Bragança *et al.* 2010; Park *et al.* 2016; Suma *et al.* 2015).

O zigoto (oócito fecundado) e o blastómero são as únicas células totipotentes — isto é, células com capacidade de originar todas as células diferenciadas do organismo adulto. Após alguns ciclos de divisão celular, estas células totipotentes formam o blastocisto, uma estrutura embrionária na qual as células começam a sofrer uma limitação gradual do seu potencial de diferenciação. Num dos pólos, o blastocisto, encerra um agregado de células denominado de botão embrionário. As células do botão embrionário são consideradas pluripotentes (não podem originar um indivíduo de forma independente) e incluem as células estaminais embrionárias com capacidade de formar todos os tipos celulares que constituem um organismo adulto, com exceção da placenta e tecidos extra-embrionários (Bragança *et al.* 2010; Suma *et al.* 2015).

As células estaminais definem-se por duas propriedades básicas, por um lado, a capacidade de se auto-renovarem indefinidamente num estado indiferenciado, mantendo o seu *pool*, e por outro, a possibilidade de se diferenciarem num ou mais tipos de células especializadas (células progenitoras de linhagem) sob condições definidas, contribuindo para a homeostasia do organismo como um todo (Bragança *et al.* 2010; Dourado *et al.* 2010; Padial-Molina *et al.* 2015; Soares *et al.* 2007; Stocum 2001; Suma *et al.* 2015). Existem duas categorias de células estaminais: células estaminais embrionárias pluripotentes e células estaminais adultas que já apresentam uma linhagem restrita (unipotentes ou multipotentes) e residem nos tecidos diferenciados (Padial-Molina *et al.* 2015; Park *et al.* 2016; Stocum 2001; Suma *et al.* 2015).

Os diferentes tecidos são compostos por células estaminais que podem ter fenótipos semelhantes na superfície celular, contudo cada uma apresenta um conjunto distinto de capacidades e limitações de acordo com a facilidade de isolamento, a capacidade proliferativa, a morbidade do dador, a capacidade osteogénica, e o número de células por grama de tecido (Bragança *et al.* 2010; Stocum 2001).

Podemos obter células estaminais a partir do sangue do cordão umbilical, da medula óssea e do sangue periférico, sendo este último o mais utilizado atualmente

(Dourado *et al.* 2010).

As células estaminais, com a sua capacidade de proliferação eficaz em cultura e a possibilidade única de originar todos os tipos de células e todos os tecidos que constituem um organismo, apresentam grandes potencialidades para o desenvolvimento de novas terapias celulares (Bragança *et al.* 2010; Park *et al.* 2016; Suma *et al.* 2015).

1.1 Células estaminais embrionárias

O entusiasmo inicial baseado na utilização de células estaminais embrionárias tem vindo a ser limitado por uma série de questões (Pipino and Pandolfi 2015; Szpalski *et al.* 2012).

A maior vantagem das células estaminais embrionárias reside na possibilidade de estas serem isoladas podendo ser propagadas *in vitro*, com um crescimento indefinido e sem que haja perda da sua pluripotência. Outra das vantagens a referir, é a ausência de quaisquer potenciais efeitos infligidos pela idade do dador. Contudo, o seu uso terapêutico é complicado devido à sua grande instabilidade epigenética quando em cultura, à incompatibilidade imunológica e ao possível desenvolvimento de neoplasias malignas ou teratomas. Estas complicações são ainda ampliadas pelas questões legais e éticas que incluem a recolha de células estaminais a partir de embriões humanos e a sua utilização na ciência. Assim, apesar da sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em muitos outros tipos celulares, estas controvérsias têm restringido o seu uso (Dourado *et al.* 2010; Park *et al.* 2016; Pipino and Pandolfi 2015; Soares *et al.* 2007; Stocum 2001; Szpalski *et al.* 2012; Tae *et al.* 2006; Xiao and Nasu 2014).

1.2 Células estaminais adultas

Muitos tecidos dos organismos adultos contêm células imaturas que são referidas como células estaminais adultas ou somáticas e servem para repor as células perdidas por apoptose ou para reparar o tecido lesado (Bragança *et al.* 2010; Caplan 2007; Padial-Molina *et al.* 2015; Stocum 2001; Xiao and Nasu 2014). São capazes de se auto-renovar e têm uma capacidade de diferenciação restrita a linhagens de células específicas do tecido ou órgão onde se encontram (Bragança *et al.* 2010; Tae *et al.* 2006; Xiao and Nasu 2014). Além de produzirem um conjunto esperado de características do tecido em que

residem, podem também dar origem a um conjunto de células totalmente diferentes (Liu *et al.* 2009; Tae *et al.* 2006; Xiao and Nasu 2014). De forma geral, a cada tipo de tecido corresponde um dado tipo de célula estaminal adulta, e a lista de tecidos e órgãos dos quais foram isoladas cresce constantemente (Bragança *et al.* 2010; Padial-Molina *et al.* 2015; Tae *et al.* 2006; Xiao and Nasu 2014).

A principal vantagem do uso de ASCs é o facto de serem autogénicas, ou seja, fazem parte dos tecidos do organismo que necessita delas, não incorrendo assim em limitações morais e reduzindo a probabilidade de rejeição imunológica (Soares *et al.* 2007; Stocum 2001). Uma outra vantagem, é que estas podem responder aos sinais de desenvolvimento que permanecem no ambiente de lesão e dessa forma sofrerem diferenciação (Park *et al.* 2016; Stocum 2001; Xiao and Nasu 2014). Muitas ASCs são, porém, difíceis de isolar, purificar e não crescem bem *in vitro*, o que torna difícil garantir uma quantidade de células suficientes para transplantação ou construção de tecidos bioartificiais, pelo que a viabilização do uso deste tipo de células está dependente do órgão fonte (Bragança *et al.* 2010; Soares *et al.* 2007; Stocum 2001; Suma *et al.* 2015). Estas podem, igualmente, sofrer alterações na sua capacidade proliferativa e de diferenciação associadas com a idade, situação que as torna menos desejáveis para uso terapêutico quando comparadas com as ESCs (Caplan 2007; Pipino and Pandolfi 2015; Stocum 2001).

As células estaminais somáticas têm menor plasticidade em comparação com as células estaminais embrionárias e são apenas multipotentes (ou por vezes unipotentes) (Bragança *et al.* 2010; Park *et al.* 2016; Suma *et al.* 2015; Tae *et al.* 2006; Xiao and Nasu 2014). Esta limitação pode ser vista como um fator positivo, evitando os problemas de formação de tumores inerentes às células estaminais (Bragança *et al.* 2010; Xiao and Nasu 2014).

É provável que, nos organismos adultos, a maior parte das células estaminais estejam num estado quiescente, mas que possam ser ativadas por fatores exógenos, entrando em divisão e diferenciação (Bragança *et al.* 2010; Xiao and Nasu 2014). A capacidade de regeneração latente das células estaminais nestes tecidos mostra claramente que o envolvimento local determina se estas vão participar na regeneração tecidual, na formação cicatricial ou permanecem num estado indiferenciado (Stocum 2001).

1.2.1 Células estaminais hematopoiéticas:

As células estaminais adultas melhor caracterizadas são as células estaminais hematopoiéticas, que originam todas as células sanguíneas tais como os eritrócitos, linfócitos e plaquetas. As células estaminais hematopoiéticas estão sobretudo localizadas na medula óssea e no sangue periférico, mas também em alguns órgãos (baço e fígado, por exemplo), e ainda no sangue do cordão umbilical e na placenta (Bragança *et al.* 2010; Stocum 2001).

1.2.2 Células estaminais mesenquimatosas:

As células estaminais mesenquimatosas são células adultas multipotentes não hematopoiéticas, com uma capacidade de auto-renovação intrínseca e com um perfil de diferenciação mesodérmico muito diverso (capacidade de diferenciação em células mesodérmicas e não mesodérmicas). Existem na medula óssea e outros tecidos músculo-esqueléticos (tecido adiposo, sangue periférico, sangue do cordão umbilical, fígado, e tecidos fetais) (Caplan 2007; Liu *et al.* 2009; Padial-Molina *et al.* 2015; Pipino and Pandolfi 2015; Tae *et al.* 2006) e contribuem para a homeostasia destes tecidos, bem como para o suporte, crescimento e diferenciação de células hematopoiéticas primitivas (Tae *et al.* 2006).

Especificamente, as MSCs para que possam ser definidas como tal, devem 1) ser *plastic-adherent* sob condições padrão de cultura, 2) expressar marcadores específicos de superfície, tais como: CD105, CD73, e CD90 e 3) inibir a expressão dos seguintes: CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19, e das moléculas de superfície de HLA-DR (Kawashima 2012; Liu *et al.* 2009; Padial-Molina *et al.* 2015; Park *et al.* 2016; Szpalski *et al.* 2012). Quando isoladas a partir de diferentes tecidos mostram características fenotípicas semelhantes, no entanto, apresentam diferentes propensões para proliferar e se diferenciar em resposta ao estímulo de diferentes fatores de crescimento (Liu *et al.* 2009; Pipino and Pandolfi 2015).

Estas células têm a capacidade de se diferenciar em osso, cartilagem, tecido adiposo, tendinoso e muscular, matriz da medula óssea, células epiteliais e neurónios quando expostas a combinações específicas de fatores de crescimento (Bragança *et al.* 2010; Caplan 2007; Padial-Molina *et al.* 2015; Park *et al.* 2016; Pipino and Pandolfi 2015; Stocum 2001; Szpalski *et al.* 2012). Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos *in vivo*

subjacentes a estes sinais reguladores uma vez que muitas destas substâncias químicas testadas *in vitro* não existem naturalmente no ser humano ou em animais experimentais (Liu *et al.* 2009).

A capacidade de regeneração do tecido ósseo pelas MSCs deve-se aos seus efeitos parácrinos. Estas segregam substâncias bioativas que são capazes de promover a migração, proliferação e diferenciação das células que as rodeiam (Pipino and Pandolfi 2015). As macromoléculas bioativas são igualmente imunoreguladoras e servem para estruturar microambientes regenerativos em áreas teciduais lesadas (Caplan 2007).

Facilmente se diferenciam em células osteoblásticas e apresentam elevado potencial osteogénico, condrogénico e adipogénico (Bragança *et al.* 2010; Pipino and Pandolfi 2015; Stocum 2001; Szpalski *et al.* 2012; Xiao and Nasu 2014). A expressão do antigénio SB-10 tem especial importância para a engenharia do tecido ósseo. A molécula de adesão de leucócitos ativada pelo SB-10 tem sido implicada na diferenciação de osteoblastos a partir de MSCs (Liu *et al.* 2009; Szpalski *et al.* 2012; Tae *et al.* 2006).

O potencial de diferenciação das MSCs em osteoblastos é influenciado por muitos fatores, incluindo a densidade de implantação, o material da matriz, e as condições de crescimento (constituintes do meio). A força mecânica é também um componente integral da fisiologia do osso, da sua homeostasia, remodelação e reparação. Esta não só aumenta a atividade dos osteócitos, mas também induz a diferenciação das MSCs (Szpalski *et al.* 2012).

Mecanismos naturais quimioatrativos podem trazer MSCs de qualquer local para as zonas de dano tecidual para estabelecerem microambientes com propriedades reparadoras/regenerativas. A idade do indivíduo, a extensão do dano tecidual, e a concentração local e sistémica de MSCs, provavelmente, desempenham um papel na taxa de extensão da reparação e/ou regeneração de tecido lesado (Caplan 2007; Pipino and Pandolfi 2015).

Através da aplicação direta ou marcação de MSCs para os locais onde os tecidos se encontram lesados, seria possível controlar a extensão dos danos, a morte celular, a formação de cicatrizes, e subsequentemente a regeneração de vários tecidos (Caplan 2007; Pipino and Pandolfi 2015).

As MSCs têm sido utilizadas nos processos de engenharia óssea pois são células abundantes, relativamente fáceis de obter e isolar (encontram-se comercialmente

disponíveis), e possuem uma grande capacidade de expansão em cultura mantendo o seu crescimento e a sua pluripotência, podendo ser estimuladas para adquirir propriedades específicas (Bragança *et al.* 2010; Caplan 2007; Liu *et al.* 2009; Szpalski *et al.* 2012; Tae *et al.* 2006). Encontram-se geralmente presentes nos tecidos conjuntivos de quase todos os órgãos mas, para fins terapêuticos, são mais convenientemente isoladas da medula óssea e do sangue do cordão umbilical (Bragança *et al.* 2010; Liu *et al.* 2009; Padial-Molina *et al.* 2015; Szpalski *et al.* 2012).

1.2.2.1 Células estaminais mesenquimatosas derivadas de medula óssea:

A medula óssea contém células estaminais mesenquimatosas que suportam as células estaminais hematopoiéticas e garantem células progenitoras para os vários tecidos mesenquimatosos (adipócitos, osteoblastos e condrócitos) (Suma *et al.* 2015; Tae *et al.* 2006). Quando estimuladas por sinais específicos do tecido lesado, estas células podem ser libertadas a partir do seu nicho na medula óssea (mobilização) e entrar em circulação sendo recrutadas para o tecido alvo, onde sofrem diferenciação *in situ* e contribuem para a regeneração e homeostasia do mesmo (Liu *et al.* 2009; Pipino and Pandolfi 2015; Suma *et al.* 2015). Apesar destas células poderem ser isoladas do sangue periférico, a medula óssea contém mais células estaminais com potencial osteogénico que o primeiro (Stocum 2001; Szpalski *et al.* 2012). As BMSCs são geralmente isoladas a partir da aspiração de medula óssea (normalmente a partir da crista ilíaca superior apesar de existirem outras fontes) e representam aproximadamente entre 0,001%-0,01% das células presentes (Padial-Molina *et al.* 2015; Pipino and Pandolfi 2015; Stocum 2001; Szpalski *et al.* 2012; Tae *et al.* 2006).

Tal como as restantes células mesenquimatosas as BMSCs perdem a sua multipotência, no entanto, o seu potencial osteogénico parece ser um dos últimos fenótipos da linhagem a ser comprometido (Szpalski *et al.* 2012).

A capacidade das BMSCs se diferenciarem em células osteoblásticas e formarem tecido ósseo tem sido extensivamente investigada, comparada e contrastada com outros tipos celulares (Pipino and Pandolfi 2015; Szpalski *et al.* 2012). Szpalski *et al.*, comprova que estas podem ser ferramentas mais eficazes do que os próprios osteoblastos (células estromais primária) para a reparação e regeneração de tecido ósseo (Szpalski *et al.* 2012). Embora as BMSCs possam produzir tecido ósseo sob diferentes condições ambientais,

determinadas situações melhoram a sua diferenciação osteoblástica e maximizam a produção óssea (Pipino and Pandolfi 2015; Szpalski *et al.* 2012). Independentemente do método utilizado para a sua colheita, quando se pretendem promover a sua diferenciação em células com fenótipo de osteoblasto, estas devem ser cultivadas em meios de cultura contendo dexametasona, b-glicerofosfato, e ácido L-ascórbico (Szpalski *et al.* 2012; Tae *et al.* 2006).

A terapia com base em BMSCs envolve o transplante de células estaminais autólogas ou alogénicas através de aplicação local ou infusão sistémica (Szpalski *et al.* 2012; Tae *et al.* 2006). O princípio fundamental da terapia *in vivo* tendo por base a utilização de BMSCs em engenharia óssea é que as células indiferenciadas após migrarem para o local da lesão, irão, sob a influência dos sinais locais, sofrer diferenciação em células com o fenótipo apropriado para a reparação do tecido lesado (Pipino and Pandolfi 2015; Szpalski *et al.* 2012; Tae *et al.* 2006).

Esforços significativos têm sido feitos no sentido de identificar diferentes fontes de MSCs para além da medula óssea, uma vez que há um certo número de inconvenientes associados com a aquisição BMSCs, incluindo dor e morbilidade do dador. Além disso, o número de células viáveis obtidas a partir da medula óssea é muitas vezes insuficiente (Padial-Molina *et al.* 2015; Pipino and Pandolfi 2015).

Em suma, apesar de existirem fontes celulares alternativas, as BMSCs continuam a ser o tipo celular primordial a utilizar em engenharia óssea. Uma vez que estas só são acessíveis por aspiração, é necessário desenvolver métodos mais eficientes para a sua obtenção (Szpalski *et al.* 2012).

1.3 Engenharia óssea: estratégias e técnicas

A reparação e regeneração óssea são um processo dinâmico que envolve uma complexa interligação entre substrato, células e o ambiente em que se encontram (Park *et al.* 2016; Soares *et al.* 2007; Szpalski *et al.* 2012).

As deficiências ósseas da cavidade oral diferem relativamente à sua extensão e etiologia, podendo ir desde a perda localizada de osso alveolar devido a doença periodontal até a uma grande atrofia óssea como consequência de uma variedade de síndromes, incluindo lesões traumáticas ou reabsorção óssea associada com lesões

tumorais (Padial-Molina *et al.* 2015). Com o decorrer dos avanços tecnológicos, a medicina regenerativa pode ser definida pela capacidade de substituir ou regenerar células humanas, tecidos ou órgãos, e restaurar ou estabelecer funções normais do organismo (Park *et al.* 2016). Esta requer a migração de células específicas para a área lesada, a sua proliferação e simultaneamente um substrato biológico para o crescimento de tecido novo (Padial-Molina *et al.* 2015).

O potencial de crescimento e pluripotência das células estaminais embrionárias e a plasticidade crescente das células estaminais adultas, particularmente da medula óssea, torna as mesmas potencialmente úteis para a substituição de tecidos (Caplan 2007; Stocum 2001; Szpalski *et al.* 2012; Xiao and Nasu 2014).

Embora os mecanismos exatos que regulam o processo de regeneração óssea a nível molecular não sejam ainda completamente claros, têm sido propostos vários métodos (Padial-Molina *et al.* 2015). Hoje em dia há pelo menos 3 abordagens celulares para a regeneração de tecido ósseo: 1) transplantes de células estaminais, ou derivados; 2) utilização de células estaminais ou derivados para a construção de tecidos bioartificiais recorrendo a uma membrana biomimética, para implantação no corpo; e 3) estimulação *in vivo* da proliferação de células estaminais residentes e diferenciação para regenerar tecidos no local da lesão (Caplan 2007; Liu *et al.* 2009; Stocum 2001; Szpalski *et al.* 2012; Xiao and Nasu 2014).

Durante um longo período de tempo o enxerto ósseo autógeno foi considerado o *gold-standart* para a regeneração óssea *in vivo* (Pipino and Pandolfi 2015). Esta técnica apresenta inúmeras desvantagens, incluindo a disponibilidade limitada de autoenxertos, a morbilidade associada no local dador e a ausência de células desenvolvidas por meio de aloenxertos e xenoenxertos, determinando assim fracas propriedades osteoindutoras. Para superar estas limitações, o uso de fatores de crescimento incorporados em transportadores, a estimulação da produção destes fatores de forma seletiva utilizando terapia genética, e a utilização de construções celulares expandidas estão a ser utilizados em diferentes áreas da reconstrução maxilofacial (Padial-Molina *et al.* 2015; Pipino and Pandolfi 2015).

A engenharia de regeneração óssea tem capitalizado um número crescente de tecnologias inovadoras. Um dos maiores avanços foi a incorporação de células estaminais mesenquimatosas, que se diferenciam numa grande variedade de tecidos consoante as

necessidades individuais (Szpalski *et al.* 2012; Tae *et al.* 2006). Com esta inovação surgiram, contudo, novos problemas em guiar a diferenciação celular (Szpalski *et al.* 2012).

Apesar das MSCs poderem ser facilmente isoladas e expandidas em cultura, mantendo a sua capacidade de diferenciação, há atualmente pouca informação disponível sobre o comportamento destas células estaminais *in vivo* e qual o papel preciso na reparação ou regeneração de tecidos (Tae *et al.* 2006).

O uso clínico de MSCs para regeneração óssea na cavidade oral é geralmente acompanhado pela utilização de matrizes, moléculas bioativas e técnicas de terapia genética (Padial-Molina *et al.* 2015).

Para a diferenciação das MSCs em osteoblastos as proteínas morfogénicas do osso desempenham um papel importante. A diferenciação dos osteoblastos começa quando as proteínas se ligam aos seus recetores conduzindo à ativação dos fatores de transcrição *Runx2* e *Osterix*, e subsequentemente à ativação de genes específicos dos osteoblastos, através da ativação da cascata *Wnt/Lrp5*, que é crucial na modelação da massa óssea (Pipino and Pandolfi 2015).

Na bioengenharia de tecidos, uma matriz (*scaffold*) é essencial pois fornece o arcabouço necessário para o transporte de nutrientes, oxigénio e resíduos metabólicos. O seu principal objetivo é o de proporcionar um suporte mecânico para a migração, proliferação, e atividade celular mimetizando uma matriz extracelular. Esta estimula a produção e a maturação de uma nova matriz extracelular que acaba por mineralizar (Padial-Molina *et al.* 2015; Pipino and Pandolfi 2015; Soares *et al.* 2007).

As matrizes podem ser combinadas com fatores de crescimento, e abordagens genéticas para servir como transportadores e para induzir estímulos para a formação de tecido ósseo (Padial-Molina *et al.* 2015; Pipino and Pandolfi 2015; Soares *et al.* 2007). A administração local ou percutânea de células em suspensão pode direcionar as mesmas diretamente para o local de dano ósseo. Contudo, sem existência de uma matriz é complicado de imaginar que as células possam assumir uma função agregadora, atrair um suprimento sanguíneo e construir uma estrutura de ordem superior (Szpalski *et al.* 2012).

Uma matriz ideal para a engenharia de tecidos deve apresentar certas propriedades fundamentais, incluindo ser biocompatível, biodegradável, porosa, mecanicamente estável, permitir a condução e deposição celular para a produção de matriz extracelular e

a transmissão de marcadores biomoleculares (Padial-Molina *et al.* 2015; Pipino and Pandolfi 2015; Stocum 2001).

No geral, membranas ósseas vazias conduziram a um crescimento celular insatisfatório e a pouco ou inexistente tráfego sistêmico. Como tal, os cientistas viraram a sua atenção para a implantação ou recrutamento celular mediado por fatores de crescimento em matrizes. As células podem ser implantadas em matrizes naturais (colagénio, alginato, agarose, derivados do ácido hialurónico...), sintéticas e minerais (cerâmicas policristalinas de hidroxiapatite...). Logo que as células se encontrem implantadas, a tensão de oxigénio, o pH, os fatores de crescimento, os esteroides e as condições hidrodinâmicas e mecânicas podem ser manipuladas para controlar a diferenciação celular e a formação tecidual. Contudo, a impossibilidade de promover a criação *in vitro* do crescimento e perfusão vascular veio limitar este “*design*” (Szpalski *et al.* 2012).

Escolher o tipo celular certo para implantar numa membrana permanece um enigma. Resultados promissores foram obtidos com a utilização de células estaminais. Enquanto que uma diferenciação celular guiada de células estaminais já se manifesta um sucesso a diversidade presente na linhagem pode representar um benefício inesperado (Padial-Molina *et al.* 2015; Pipino and Pandolfi 2015; Szpalski *et al.* 2012).

Estudos de formação óssea têm demonstrado que a formação de novos vasos sanguíneos precede a evidência morfológica de formação óssea. Recentemente, alguns grupos têm-se centrado sobre a possibilidade de incorporação de fatores vasculogénicos para melhorar o crescimento vascular interno *in situ*, numa tentativa de melhorar a osteogénese (Padial-Molina *et al.* 2015; Szpalski *et al.* 2012). Em última análise, as células que iniciam vasculogénese e angiogénese são cruciais para a formação de tecido ósseo. Sem o desenvolvimento de uma rede vascular que permita um suprimento sanguíneo adequado, garantido oxigenação e chegada de nutrientes a formação óssea ficará comprometida (Padial-Molina *et al.* 2015; Stocum 2001; Szpalski *et al.* 2012).

Foi demonstrado que muitos tipos de células estaminais são capazes de formar tecido ósseo, mas ainda não é claro que estas sejam o melhor candidato ou que combinação celular será a melhor para promover a angiogénese e a osteogénese (Padial-Molina *et al.* 2015; Park *et al.* 2016; Szpalski *et al.* 2012).

Uma engenharia óssea bem-sucedida não só depende do tipo de células utilizado, mas também do tipo de matriz (material e estrutura) e das características do meio de cultura (Liu *et al.* 2009; Padial-Molina *et al.* 2015; Szpalski *et al.* 2012).

Para que a medicina regenerativa se torne uma realidade continua a ser necessária uma grande investigação. Primeiro, precisamos determinar que conjuntos específicos de marcadores podem ser utilizados para identificar e purificar células estaminais adultas para diferenciação, determinar o seu potencial de divisão, auto-renovação e diferenciação e determinar se este potencial aumenta ou diminui com a idade do dador. Em segundo lugar, precisamos de saber como propagar facilmente as células estaminais embrionárias no seu estado indiferenciado e saber que combinações de sinais e marcadores irão direcionar a sua diferenciação *in vitro* até ao precursor desejado ou ao fenótipo celular final. (Liu *et al.* 2009; Padial-Molina *et al.* 2015; Stocum 2001).

Em casos de transplantação de ASCs, a compreensão do processo pelo qual ocorre a diferenciação não é de tanta importância desde que estas consigam responder aos sinais de desenvolvimento no local da lesão. A questão relativamente às ASCs é como expandir as mesmas *in vitro* para garantir um número suficiente para transplantação ou construção de tecido bioartificial (Stocum 2001).

A literatura publicada sobre a aplicação clínica de células estaminais para regeneração óssea craniofacial é abundante e muito variada, contudo a maioria dos estudos foram realizados *in vitro* o que reflete a necessidade de ensaios clínicos controlados para comprovação científica.

2. OBJETIVOS

Este estudo procurou seguir o modelo de pesquisa PICO (*Population, Intervention, Comparison, Outcome*), estruturando a abordagem da seguinte forma:

População: Em pacientes adultos com deficiências ósseas alveolares

Intervenção: A utilização de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea para regeneração alveolar é mais eficaz.

Comparação: Quando comparada com terapias com base na utilização de enxertos ósseos autógenos e com outros tipos de células estaminais.

Resultados: A nível de localização do defeito ósseo; volume, altura e densidade óssea; sucesso da terapia implantar/necessidade de transplante ósseo adicional; e evidência de regeneração de novo tecido ósseo.

“Em pacientes adultos com deficiências ósseas alveolares a utilização de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea para regeneração alveolar é mais eficaz quando comparada com outras terapias com base na utilização de enxertos ósseos autógenos e outros tipos de células estaminais a nível da localização do defeito ósseo; volume, altura e densidade óssea; sucesso da terapia implantar/necessidade de transplante ósseo adicional; e evidência de regeneração de novo tecido ósseo?”

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Critérios de seleção dos estudos

Para esta revisão de literatura foram selecionados ensaios clínicos, estudos coorte e revisões sistemáticas. Foram também selecionados pacientes adultos com defeitos ósseos. De uma forma geral foram estabelecidos os seguintes parâmetros de avaliação: localização do defeito ósseo; volume, altura e densidade óssea; sucesso da terapia implantar/necessidade de transplante ósseo adicional; e evidência de regeneração de novo tecido ósseo.

3.1.1 Critérios de inclusão

1. Estudos clínicos em humanos;
2. Artigos escritos em inglês, português ou espanhol;
3. Estudos que especifiquem o tipo de defeito ósseo em tratamento;
4. Estudos cujo tratamento inclua regeneração alveolar;
5. Estudos cujas células utilizadas incluam células estaminais mesenquimatosas aspiradas da medula óssea;

3.1.2 Critérios de exclusão

1. Estudos clínicos apenas realizados em animais;
2. Estudos que apresentem outro idioma que não português, inglês ou espanhol;
3. Estudos *in vitro*;
4. Estudos que não especificam o tipo de complicações/ locais com necessidade de regeneração óssea;
5. Estudos cujo tratamento não inclua pelo menos um paciente com necessidade de regeneração alveolar;
6. Estudos cujas células/compostos celulares utilizados não incluam as células estaminais mesenquimatosas aspiradas da medula óssea;

3.2 Estratégia de busca e identificação dos estudos

No dia 10 de Novembro de 2015, foi efetuada uma pesquisa com recurso a uma base de dados secundária (*Cochrane* – www.cochrane.org) com as palavras-chave: *mesenchymal stem cells* e *regenerative oral medicine*, não tendo sido obtido nenhum resultado relevante para a presente dissertação.

Posteriormente, foi efetuada uma pesquisa com recurso a uma base de dados primária *MEDLINE* (através de *PubMed* – www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.com) com os termos *MeSH* (*Medical Subject Headings*): *mesenchymal stem cells* e *regenerative oral medicine*, o conector booleano “AND” e com o seguinte filtro: artigos escritos em língua inglesa, portuguesa ou espanhola. Não foram adicionados outros filtros, como por exemplo tipo de artigo científico ou data de publicação, uma vez que, ao efetuar esta seleção os resultados poderiam não englobar estudos importantes para esta revisão.

Esta pesquisa foi repetida, utilizando os mesmos termos anteriormente referidos nos dias 7 e 17 de Fevereiro de 2015. Um total de 217 artigos foram identificados pela base de dados e foram avaliados pela elegibilidade. Após apreciação do seu título e resumo, 68 artigos foram selecionados para avaliação do texto integral. Destes, apenas 54 apresentaram livre acesso ao conteúdo total do estudo.

Numa primeira fase, foi feita a separação entre artigos de estudos clínicos (randomizados ou controlados), revisões sistemáticas e estudos coorte com relevância para a prática clínica de artigos puramente teóricos ou descritivos. Dos 54 artigos analisados, 34 foram incluídos no primeiro grupo anteriormente referido sendo considerados aptos a ser avaliados como relevantes clinicamente; dos 20 estudos restantes 9 foram incluídos para a construção do fundamento teórico desta dissertação.

3.3 Recolha e análise dos dados

Todos os estudos considerados relevantes para esta revisão foram submetidos a uma avaliação científica crítica de acordo com *The Critical Appraisal Skills Program* (*CASP*) da *Public Health Resource Unit* (2006). Esta análise foi efetuada por dois avaliadores independentes, sem acesso às avaliações de cada um. Em situações em que não houve consenso, as diferenças foram discutidas até existir um acordo entre

avaliadores. Contudo, estudos onde mais de metade das perguntas do questionário CASP apresentaram resposta negativa foram considerados de alto risco.

4. RESULTADOS

Um total de 217 artigos foram identificados pela base de dados e foram avaliados pela elegibilidade. Após apreciação do seu título e resumo, 68 artigos foram selecionados para avaliação do texto integral. Destes, apenas 54 apresentaram livre acesso ao conteúdo total do estudo.

Numa primeira fase, foi feita a separação entre artigos de estudos clínicos (randomizados ou controlados), revisões sistemáticas e estudos coorte com relevância para a prática clínica de artigos puramente teóricos ou descritivos. Dos 54 artigos analisados, 34 foram incluídos no primeiro grupo anteriormente referido sendo considerados aptos a ser avaliados como relevantes clinicamente; dos 20 estudos restantes 9 foram incluídos para a construção do fundamento teórico desta dissertação. Previamente a submeter os 34 artigos do primeiro grupo à avaliação pelas fichas CASP (*critical appraisal skills programme*) foram determinados os critérios de inclusão, anteriormente referidos. Após a aplicação dos critérios de inclusão aos 34 estudos, 4 estudos foram incluídos e submetidos à avaliação pelas fichas CASP (ver seleção de estudos, figura 1)

Destes, 2 são revisões sistemáticas, 1 é um ensaio clínico controlado e aleatorizado (RCT) e 1 é um estudo de coorte. Foi retirada toda a informação necessária para o preenchimento completo da ficha CASP específica de cada estudo para desta forma comprovar a evidência científica dos mesmos.

Os estudos excluídos e respetivo motivo de exclusão estão representados na Tabela 1 (ver ANEXO A).

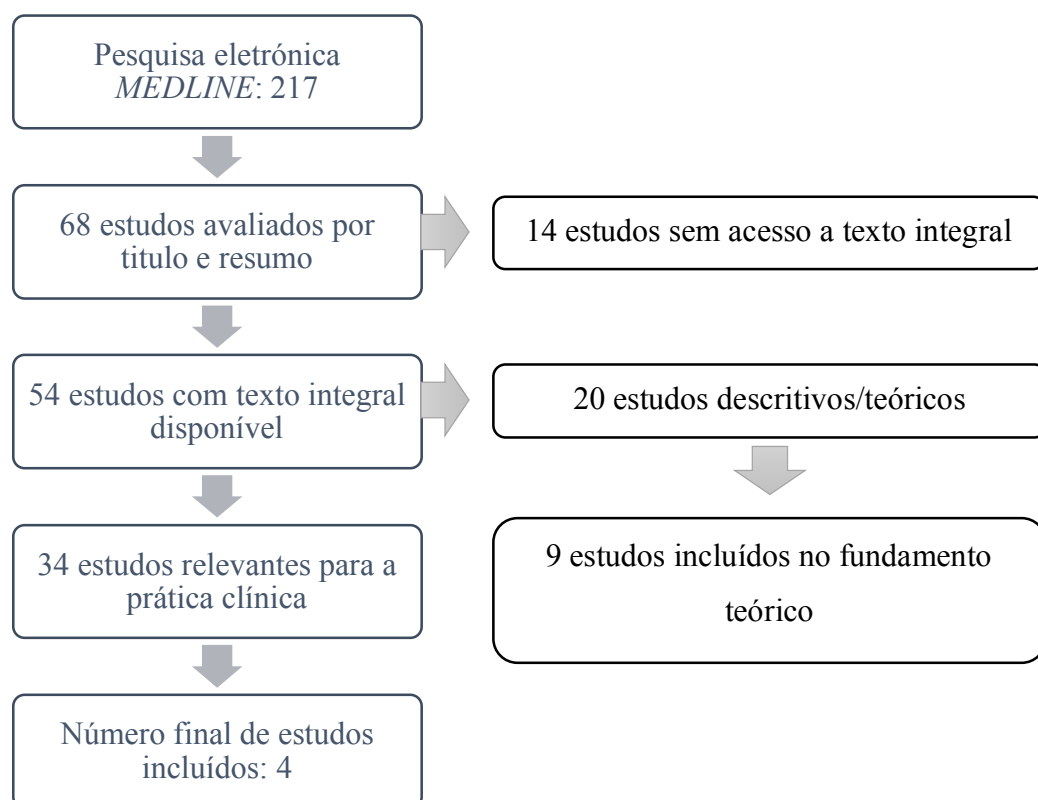


Figura 1. Fluxograma de seleção de estudos.

A presente revisão sistemática inclui 4 estudos que abordam a utilização de células estaminais mesenquimatosas da medula óssea no tratamento de defeitos ósseos orais e analisam criticamente a sua validade, metodologia e resultados.

A informação extraída dos estudos para elaboração das fichas CASP está apresentada nos anexos B, C, D e E.

4.1 População e intervenção

A amostra total é composta por 419 pacientes com idade média de 51 anos (variando entre 19 e 78 anos). O período médio de seguimento corresponde a 21 meses (com amplitude de 6 semanas a 60 meses). Relativamente à percentagem de desistências médias, apenas o estudo clínico aleatorizado, de Kaigler *et al.* (2013), refere a desistência de um paciente durante o seguimento.

O número de diferenças entre os estudos utilizados torna difícil estabelecer uma comparação global justa. Contudo, de uma forma geral, foram estabelecidos os seguintes

parâmetros de avaliação: localização do defeito ósseo; volume, altura e densidade óssea; sucesso da terapia implantar/necessidade de transplante ósseo adicional; evidência de regeneração de novo tecido ósseo.

4.1.1 Localização do defeito ósseo

Das intervenções realizadas tem-se: 39 casos de defeitos ósseos localizados pós-extração dentária, 37 casos de reabsorção/ressecção mandibular, 51 casos de necessidade de elevação do pavimento do seio maxilar, 17 casos de absorção óssea devido a patologia periodontal, 6 casos de defeito ósseo horizontal, 3 casos de defeito ósseo vertical, 4 casos de fenda palatina, 1 caso de ressecção de ameloblastoma, 1 caso de ressecção de hemangioma e 1 cistectomia.

4.1.2 Técnica regenerativa utilizada

Nos 4 estudos avaliados a técnica regenerativa não é constante. Kaigler *et al.* (2013), demonstra a utilização de uma terapia recorrendo a uma suspensão gelatinosa com BMSCs cultivadas em meio de cultura especial – nomeando a cultura como células regeneradores teciduais (CRTs); Yamada *et al.* (2013), utiliza precursores de tecidos ósseos injetáveis compostos por BMSCs juntamente com plasma rico em plaquetas (TEB); Maria *et al.* (2007), relata o uso de BMSCs sem meio de cultura subjacente; Padial-Molina *et al.* (2015), apresentam a utilização de BMSCs cultivadas num dos seguintes meios de cultura:

- a) *Ixmielocel –T* (cultura com BMSCs, monócitos e macrófagos expandidos);
- b) Células CD34⁺ isoladas a partir de aspiração da medula óssea;
- c) Meio rico em células de indução osteogénica com 100 Nm de dexametasona + 10 Mm de b-glicerofosfato e 50 mg/ml de ácido ascórbico-2-fosfato;
- d) Meio rico em células de indução osteogénica com 50 ug/ml de ácido L- ascórbico + 10 Mmol/L de glicerolfosfato e 10 E–7 mol/L de dexametasona;
- e) Meio de indução osteogénica com dexametasona;
- f) Meio de indução osteogénica com dexametasona + sódio β- glicerofosfato e ácido L-ascórbico 2-fosfato;

- g) Meio de indução osteogénica com 100 nM de dexametasona + 10 mM de β -glicerofosfato de sódio e 25 mg/ml de ácido L-ascórbico 2-fosfato;

4.1.3 Volume, altura e densidade óssea

O progresso da regeneração óssea é avaliado maioritariamente com base em alterações radiográficas e em imagens de tomografia computadorizada o que nos fornece o melhor método radiológico para proceder à análise morfológica e qualitativa do osso na região regenerada facilitando assim a avaliação da densidade óssea.

Padial-Molina *et al.* (2015), relata que dos estudos avaliados foi possível estabelecer a comparação entre dois RCTs que partilhavam as seguintes características: origem celular (crista ilíaca), tipo de defeito (elevação do seio) e grupo de controlo (osso bovino + enxerto autógeno). Globalmente trataram 69 cavidades (46 testes e 23 controlos) em 38 pacientes, podendo-se concluir que a combinação de osso bovino, com células aspiradas da medula óssea fornece um ganho de volume radiográfico mais elevado ($1,74 \pm 0,69$) quando comparado com o grupo de controlo ($1,33 \pm 0,62$ ml).

Os resultados densitométricos médios, no estudo realizado por Yamada *et al.* (2013), foram obtidos por meio de tomografia computadorizada avaliando a quantidade de osso regenerado por TEB. Os resultados obtidos variaram consoante o tipo de terapia regenerativa/defeito ósseo e com o tempo de seguimento: regeneração óssea guiada (ROG) = 309.1, 381.0; elevação do pavimento do seio (EPS) = 354.3, 455.4 aos 3 e 6 meses, respetivamente; preservação de alvéolo pós-extracional (PA) = 388.0 unidades Hounsfield em 3 meses. Todos os resultados foram mais elevados do que a linha de base pré-operatória ($p < 0,001$) definida para este estudo.

No estudo de Kaigler *et al.* (2013), às 6 semanas, comprovou-se maior altura óssea radiográfica no grupo submetido à terapia regenerativa com base em células regeneradoras teciduais do que no grupo submetido a regeneração óssea guiada ($p = 0,01$). No geral, os tecidos regenerados nos locais com CRTs exibiram uma aparência clinicamente semelhante ao tecido ósseo primitivo, demonstrando maior densidade e alta vascularização. As biópsias ósseas a partir dos locais de regeneração foram analisadas 6 e 12 semanas após o tratamento usando μ CT tridimensional e histomorfometria. A fração de volume ósseo (FVO) e a densidade mineral óssea (DMO) foram os *outcomes* primários tidos em conta pela μ CT. A análise às 6 semanas mostrou que o FVO para o grupo ROG

foi de $13 \pm 6\%$, em comparação com $28 \pm 8\%$ para o grupo de CRTs ($p = 0,08$). Da mesma forma, nas comparações de resultados da DMO entre ROG e os grupos tratados com CRTs, o ultimo grupo apresentou uma DMO duas vezes maior ($195,0 \pm 63,3$ mg/cc) no osso regenerado do que o grupo da ROG ($85 \pm 46,3$ mg/cc); ($p = 0,1$).

4.1.4 Sucesso da terapia implantar/necessidade de transplante ósseo adicional

Apenas dois dos estudos analisados avaliaram a eficácia do tratamento com implantes e a necessidade de transplante ósseo adicional.

Yamada *et al.* (2013), referiu que todos os implantes dentários colocados na região regenerada estavam funcionais e que a taxa de sucesso obtida foi de 100%.

Kaigler *et al.* (2013), mostra que o maior número de defeitos ósseos residuais está presente nos grupos tratados inicialmente com ROG. Estes apresentaram uma maior necessidade (às 6 e 12 semanas) para receber procedimentos de enxerto ósseo adicionais no momento da colocação do implante, em relação aos grupos tratados com CRTs. Todos os grupos, posteriormente aos procedimentos regenerativos, apresentaram evidência clínica de integração do implante no osso regenerado e foram capazes de suportar a carga biomecânica quando restaurados 6 meses após a colocação. A estabilidade do implante foi seguida durante um 1 ano, e todos os implantes permaneceram funcionalmente integrados no final do estudo.

4.1.5 Evidência de regeneração de tecido ósseo

Segundo Maria *et al.* (2007), a cintigrafia óssea mostrou remodelação e mineralização óssea na região do transplante mandibular depois da realização do mesmo. A tomografia computadorizada forneceu evidência de formação de novo tecido ósseo.

No estudo de Yamada *et al.* (2013), para os casos de regeneração óssea guiada, elevação do pavimento do seio e preservação do alvéolo pós-extracional as radiografias mostraram claramente que o defeito ósseo foi preenchido com osso recém-formado após a injeção de TEB, e pouca reabsorção ocorreu durante o período de follow-up. Observações histológicas de amostras das biopsias comprovaram igualmente a presença de tecido ósseo recém-formado.

Padial-Molina *et al.* (2015), refere que a percentagem média ponderada de osso vital obtida nos estudos avaliados ($18,02 \pm 9,1$) não é estaticamente diferente do grupo de controlo ($9,14 \pm 7,02$),

Por fim, Kaigler *et al.* (2013) obteve resultados às 12 semanas para o grupo de ROG que exibiam um preenchimento ósseo de $74,6 \pm 3,3\%$, enquanto os grupos de CRTs mostraram $80,1 \pm 2,0\%$ ($p = 0,28$). A diferença às 6 semanas entre as amostras colhidas a partir dos locais tratados com CRTs e com ROG exibem maior percentagem óssea no primeiro. Após a análise às 6 e 12 semanas, não houve diferenças estatisticamente significativas nas percentagens da relação entre a área óssea/área tecidual - 6 semanas, ROG = $19,6 \pm 4,2\%$; CRTs = $28,8 \pm 9,1\%$ ($p = 0,10$ entre os grupos); 12 semanas, ROG = $35,1 \pm 3,2\%$; CRTs = $35,2 \pm 8,9$.

5. **DISCUSSÃO**

Os resultados desta revisão sistemática demonstraram que a utilização de células estaminais da medula óssea para regeneração de defeitos ósseos alveolares é uma opção terapêutica viável, uma vez que tanto as taxas de sobrevivência dos implantes (aproximadamente 100%) como a percentagem de osso regenerado foram elevadas, após um período de seguimento médio de 21 meses.

Estes valores estão em concordância com outros estudos que também verificaram a capacidade de regeneração óssea das células estaminais da medula óssea expandidas *in vitro* e *in situ* quando implantadas em vários modelos animais que apresentavam defeitos ósseos. Os resultados satisfatórios permitiram assim a aprovação de ensaios clínicos para a implantação de compostos de BMSCs para o tratamento de grandes defeitos ósseos em humanos.

Globalmente, o problema é o fato de na maior parte da literatura disponível a eficácia da técnica ser demonstrada por meio de resultados subjetivos e apreciações qualitativas sendo que alguns estudos falham por não apresentar dados quantitativos e suficientemente objetivos. Quando o fazem, muitas vezes, os dados reportados não são comparáveis devido à variação de *outcomes* avaliados.

O objetivo da revisão sistemática de Padial-Molina *et al.* (2015) (CASP - ANEXO B), foi identificar a literatura existente sobre estudos clínicos tendo por base a utilização de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea ou células estaminais adiposas para tratar defeitos ósseos orais e analisar criticamente a sua validade, metodologia e resultados. Os autores defenderam que devido à alta variabilidade entre as diferentes variáveis, não foi considerado apropriado a realização de uma meta-análise concluindo que embora diferentes tecnologias e protocolos de atuação estejam a ser estudados nesta área, o tipo celular, a origem e o protocolo ideal de processamento permanecem ainda por definir. Reportam o uso de aspiração de células estaminais da medula óssea do osso ilíaco demonstrando assim que este local é amplamente aceite como o local de colheita padrão. No entanto, não há padronização em termos de processamento e manuseamento do material de colheita e os defeitos ósseos tratados diferem para cada ensaio clínico. Outra importante diferença entre os estudos avaliados nesta revisão é o transportador celular utilizado.

Em resumo, as principais conclusões da revisão foram que a aplicação clínica de células estaminais para a regeneração óssea por via oral promove bons resultados em termos clínicos, radiográficos e histológicos. No entanto, a significância clínica das aplicações referidas nos ensaios clínicos avaliados é muito limitada o que evidencia a necessidade de estudos melhor concebidos para reduzir o viés e a variedade de dados e, finalmente, permitir estabelecer um consenso neste campo.

No estudo coorte de Yamada *et al.* (2013)_(CASP - ANEXO C), foi avaliada a promoção de regeneração óssea utilizando precursores de tecidos ósseos injetáveis, compostos por células cultivadas e derivadas de células estaminais da medula óssea em conjunto com plasma rico em plaquetas com boa plasticidade. Foram incluídos pacientes com problemas convencionais da função mastigatória devido a grave atrofia do rebordo alveolar. Neste estudo, a principal conclusão clínica foi que as células transplantadas contribuem para o processo de formação óssea *in vivo*. Os resultados também indicaram a participação direta de BMSCs na osteogénese; estas sofrem uma diferenciação gradual em direção a uma linhagem osteoblástica contribuindo assim para a melhoria das propriedades biomecânicas do tecido ósseo *in vivo*. Estas melhorias na estrutura e função do osso refletem a atividade das células estaminais, e o osso regenerado apresenta-se semelhante ao primitivo, mantendo a sua função, o que resultou na melhoria da função mastigatória.

O resultado terapêutico no enxerto de BMSCs em pacientes com defeitos ósseos indica que o transplante de TEB pode também ser viável para outras doenças, como situações de fusão espinhal, necessidade de aumento de consolidação de fraturas, e reconstrução de vários defeitos ósseos.

A avaliação deste estudo, recorrendo à ficha CASP adequada, permite creditá-lo de um nível de evidência científica elevado. Seria importante, para permitir uma melhor avaliação das vantagens/desvantagens da técnica, a apresentação de possíveis fatores de risco terapêuticos.

A utilização de terapias inovadoras que recorrem à utilização de células estaminais mesenquimatosas derivadas da medula óssea em comparação com outras terapias de regeneração - estudos cujo tratamento incluía a utilização de transplantes autólogos ou mesmo em comparação com os resultados obtidos no tratamento com regeneração óssea guiada (tratamento convencional) - comprova a eficácia da sua

utilização quando o *outcome* considerado é a necessidade de enxerto ósseo adicional para permitir posterior terapia com implantes.

Kaigler *et al.* (2013) (CASP - ANEXO D), compara a utilização de uma terapia celular inovadora (suspensão gelatinosa de BMSCs) com um procedimento de regeneração óssea guiada para o tratamento de defeitos mandibulares localizados. Foi realizada a extração de um dente não restaurável e a sua remoção resultou numa área de defeito ósseo localizada; as células regeneradoras teciduais foram depois transplantadas nos defeitos ósseos mandibulares.

Para permitir a reentrada nos locais sujeitos a cada uma das terapias de regeneração, avaliações clínicas foram realizadas para determinar se haveria necessidade de enxerto ósseo adicional para colocação de um implante. Apesar de diferentes comprimentos e diâmetros de implantes, os tamanhos utilizados eram bastante semelhantes. A decisão de realizar o enxerto adicional foi tomada tendo em conta um dos dois cenários possíveis: 1) persistência de defeitos ósseos residuais após o tratamento inicial ou 2) deficiências ósseas (ou seja, deiscências ou fenestrações) durante a colocação do implante.

O maior número de defeitos ósseos residuais presentes nos grupos tratados inicialmente com ROG, comprovou a maior necessidade de receber procedimentos de enxerto ósseo adicionais no momento da colocação do implante, em relação aos grupos tratados com CRTs. Além disso, os grupos de ROG apresentaram ainda uma exposição implantar seis vezes maior conduzindo a uma maior necessidade de enxerto secundário, em comparação com os grupos de CRTs ($p < 0,04$).

Em ambos os tipos de terapia regenerativa houve evidência clínica de integração implantar no osso regenerado e todos os implantes permaneceram funcionalmente integrados até ao final do estudo.

Kaigler *et al.* (2013) (CASP - ANEXO D), estabeleceu ainda a comparação entre os níveis de atividade da fosfatase alcalina e os níveis de mineralização com a densidade mineral (DMO) e a fração de volume ósseo (FVO). Com uma análise do potencial osteogénico *in vitro*, tendo por base a atividade da fosfatase alcalina e a percentagem de mineralização a capacidade das CRTs foi correlacionada com os resultados clínicos de DMO e FVO para cada um dos grupos. Estes dados demonstram que houve uma correlação positiva entre a atividade da fosfatase alcalina e a FVO ($r = 0,56$, $p = 0,058$) e

uma correlação positiva estatisticamente significativa entre a atividade da fosfatase alcalina e a DMO ($r = 0,58$; $p = 0,049$). Correlações positivas com a capacidade de mineralização *in vitro* e as medidas de DMO e FVO não foram estatisticamente significativas.

Relativamente à revisão sistemática de Maria *et al.* (2007) (CASP - ANEXO E), os resultados e conclusões obtidos não foram significativos e o nível de evidência científico após submissão do estudo à análise pela ficha CASP foi baixo. É considerado um estudo de alto risco sendo que metade das respostas apresentadas foram negativas. A revisão não apresenta uma apresentação clara e precisa dos materiais e métodos utilizados, não referindo como se processou a procura dos estudos incluídos, e quais os critérios de inclusão e exclusão tidos em consideração. De todos os estudos avaliados, apenas 4 consistiram na realização de uma regeneração alveolar sendo que destes apenas um foi um ensaio clínico realizado em seres humanos. Seria igualmente importante a apresentação objetiva dos *outcomes* avaliados em cada estudo; de máxima importância ainda a referência de valores de densidade, altura e volume ósseo bem como da percentagem de tecido ósseo regenerado após o tratamento para que fosse possível estabelecer o nível de eficácia da técnica. Para além disso, deveria estar referido o período de follow-up dos estudos e os resultados a longo prazo.

Apenas os resultados do estudo de Warnke *et al.* (2004), referenciado na revisão sistemática de Maria *et al.* (2007), foram considerados para esta revisão. Foi avaliado um paciente com grande ressecção na mandíbula (da região paramediana esquerda até à região retromolar direita). O paciente teve um grau melhorado de mastigação e ficou satisfeito com o resultado estético. Os resultados globais da revisão mostram que a plasticidade das células estaminais adultas continua a ser controversa e que uma pesquisa mais aprofundada é necessária antes de poder implementar de forma segura este tipo de terapias regenerativas na prática clínica.

No início desta dissertação um outro estudo, de Katagiri *et al.* (2016), correspondeu aos critérios de inclusão previamente estabelecidos. Após análise, este não foi submetido à avaliação pelas fichas CASP visto tratar-se de um *case report*.

Relativamente às desvantagens da utilização de BMSCs, e apesar de estas não serem abordadas nos estudos incluídos, segundo Katagiri *et al.* (2016), o uso de células estaminais adultas para a regeneração de tecidos apresenta vários problemas. Destes,

destacam-se a segurança e gestão de qualidade na aspiração e manipulação das células, o alto custo e a regulação rigorosa por parte das autoridades que impedem a popularização desta abordagem.

Nesta dissertação foram incluídas 2 revisões sistemáticas a fim de garantir um número considerável de ensaios clínicos, visto que, dentro dos estudos avaliados o número daqueles que respeitavam os critérios de inclusão foi reduzido.

Dos 4 estudos avaliados e incluídos nesta revisão, 3 deles permitiram uma correta avaliação pelas fichas CASP. Apresentando um número significativo de respostas positivas o que nos permite concluir a sua evidência científica.

Apesar da amostra média dos estudos ser significativa, nenhum faz uma análise suficientemente completa da população estudada para que nos seja permitido fazer uma generalização dos resultados à população local. Para além disso, a média de idades dos pacientes avaliados não é estatisticamente significativa existindo uma grande variação entre os extremos.

Relativamente aos tempos de seguimento avaliados, estes apresentam igualmente uma grande variação nos diferentes estudos. Não sendo possível, desta forma, estabelecer qual o tempo de seguimento mínimo necessário para obter resultados eficazes.

As variações a nível da localização do defeito ósseo e do tipo de terapia regenerativa, tendo em conta o meio de cultura e a abordagem celular utilizados não permitem igualmente definir qual o protocolo de atuação ideal.

Por fim, analisando os parâmetros de avaliação tidos em conta, o número de diferenças torna difícil estabelecer uma comparação global justa e passível de tirar conclusões sobre os níveis de eficácia do tratamento.

A análise da literatura publicada sobre o uso clínico de BMSCs para regeneração óssea oral destaca a escassez de ensaios clínicos randomizados adequados e com metodologias comparáveis para que seja possível extrair conclusões globais, sendo que a maior parte da literatura avaliada é baseada em estudos *in vitro*.

6. CONCLUSÃO

Após a realização desta revisão sistemática, algumas conclusões importantes podem ser retiradas.

A literatura publicada sobre a aplicação clínica de células estaminais para regeneração óssea é abundante, mas altamente diversificada, o que reflete o facto de estas tecnologias serem relativamente recentes sendo difícil padronizar descobertas e aplicações clínicas.

A regeneração óssea com base na terapia celular proporciona uma técnica promissora, com mínima capacidade invasiva e onde o número de potenciais aplicações para usar com sucesso é alto, contudo o nível de evidência científica é baixo.

As vantagens do uso de células estaminais para regeneração óssea necessitam ainda de ser estudadas em cenários mais difíceis, onde possam mostrar o seu potencial em comparação com as opções de tratamento atuais.

Por conseguinte, a eficácia relatada nos estudos de engenharia tecidual continua a ser controversa e uma pesquisa mais aprofundada é necessária antes de poder implementar de forma segura este tipo de terapias regenerativas na prática clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez R, Lee H-L, Wang C-Y, Hong C. Characterization of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from human periodontal ligament based on cell surface markers. *Int. J. Oral Sci.* 2015 Oct 30;7(4):213–9.

Atari M, Caballé-Serrano J, Gil-Recio C, Giner-Delgado C, Martínez-Sarrà E, García-Fernández DA, et al. The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D. *Bone Elsevier Inc.*; 2012 Apr;50(4):930–41.

Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch. Oral Biol. Elsevier Ltd*; 2011;56(7):709–21.

Bragança J, Tavares Á, Belo J. células estaminais e medicina regenerativa Um admirável mundo novo. *canalBQ, Rev. da Soc. Port. bioquímica.* 2010;4–17.

Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 2007 Nov;213(2):341–7.

Choi J, Hwang H, Jang Y. The efficiency of the in vitro osteo / dentinogenic differentiation of human dental pulp cells , periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2015;35:161–8.

Dourado M, Cruz M, Enes M, Pereira M, Ribeiro A. Células Estaminais - Implicações na Biologia e Terapêutica do Cancro. 2010;7:7–14.

Hara K, Yamada Y, Nakamura S, Umemura E, Ito K, Ueda M. Potential characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth compared with bone marrow-derived mesenchymal stem cells for mineralized tissue-forming cell biology. *J. Endod. Elsevier Ltd*; 2011;37(12):1647–52.

Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg. International Association of Oral and Maxillofacial Surgery*; 2016 Jan;45(1):124–31.

Jiawen S, Jianjun Z, Jiewen D, Dedong Y, Hongbo Y, Jun S, et al. Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Epithelial Cells and Its Application in Alveolar Defect Restoration. *Stem Cells Transl. Med.* 2014 Dec 1;3(12):1504–13.

Kaigler D, Pagni G, Park CH, Braun TM, Holman LA, Yi E, et al. Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: A randomized, controlled feasibility trial. *Cell Transplant.* 2013;22(5):767–77.

Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Hibi H. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head Face Med. Head & Face Medicine*; 2016;12(1):5.

Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration? *Arch. Oral Biol. Elsevier Ltd*; 2012 Nov;57(11):1439–58.

Khojasteh A, Sadeghi N. Application of buccal fat pad-derived stem cells in combination with autogenous iliac bone graft in the treatment of maxillomandibular atrophy: A preliminary human study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg. International Association of Oral and Maxillofacial Surgery*; 2016;(January).

- Kim J, Bae WG, Choung HW, Lim KT, Seonwoo H, Jeong HE, et al. Multiscale patterned transplantable stem cell patches for bone tissue regeneration. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2014;35(33):9058–67.
- Lacerda-Pinheiro S, Dimitrova-Nakov S, Harichane Y, Souyri M, Petit-Cocault L, Legrès L, et al. Concomitant multipotent and unipotent dental pulp progenitors and their respective contribution to mineralised tissue formation. *Eur. Cell. Mater.* 2012;23:371–86.
- Liu X, Liao X, Luo E, Chen W, Bao C, Xu HHK. Mesenchymal stem cells systemically injected into femoral marrow of dogs home to mandibular defects to enhance new bone formation. *Tissue Eng. Part A*. 2014;20(3-4):883–92.
- Liu Z-J, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 2009;106(6):984–91.
- Ma J, Both SK, Yang F, Cui F-Z, Pan J, Meijer GJ, et al. Concise Review: Cell-Based Strategies in Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl. Med.* 2014 Jan 1;3(1):98–107.
- Maria O, Khosravi R, Mezey E, Tran S. Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Dis.* 2007 Jan;13(1):11–6.
- Mason S, Tarle S a, Osibin W, Kinfu Y, Kaigler D. Standardization and safety of alveolar bone-derived stem cell isolation. *J. Dent. Res.* 2014;93(1):55–61.
- Miura M, Miura Y, Sonoyama W, Yamaza T, Gronthos S, Shi S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine in craniofacial region. *Oral Dis.* 2006;12(6):514–22.
- Padial-Molina M, O’Valle F, Lanis A, Mesa F, Dohan Ehrenfest DM, Wang HL, et al. Clinical application of mesenchymal stem cells and novel supportive therapies for oral bone regeneration. *Biomed Res. Int.* 2015;2015.
- Park YJ, Cha S, Park YS. Regenerative applications using tooth derived stem cells in other than tooth regeneration: A literature review. *Stem Cells Int.* Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016.
- Pipino C, Pandolfi A. Osteogenic differentiation of amniotic fluid mesenchymal stromal cells and their bone regeneration potential. *World J. Stem Cells.* 2015;7(4):681–90.
- Soares AP, Knop LAH, Jesus AA De, Araújo TM De. Células-tronco em odontologia. *Rev. Dent. Press Ortod. e Ortop. Facial.* 2007;12(1):33–40.
- Srouji S, Ben-David D, Fromigué O, Vaudin P, Kuhn G, Müller R, et al. Lentiviral-mediated integrin $\alpha 5$ expression in human adult mesenchymal stromal cells promotes bone repair in mouse cranial and long-bone defects. *Hum. Gene Ther.* 2012;23(2):167–72.
- Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen.* 2001;9(6):429–42.
- Suma GN, Arora MP, Lakhanpal M. Stem cell therapy: A novel treatment approach for oral mucosal lesions. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2015;7(1):2–8.
- Syed-Picard FN, Shah G a, Costello BJ, Sfeir C. Regeneration of periosteum by human bone marrow stromal cell sheets. *J. Oral Maxillofac. Surg.* Elsevier Inc; 2014;72(6):1078–83.

Szpalski C, Barbaro M, Sagebin F, Warren SM. Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques—Part II: Cell Types. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2012;18(4):258–69.

Tae S-K, Lee S-H, Park J-S, Im G-I. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed. Mater.* 2006;1(2):63–71.

Wang P, Liu X, Zhao L, Weir MD, Sun J, Chen W, et al. Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium. *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*; 2015;18:236–48.

Wang P, Zhao L, Chen W, Liu X, Weir MD, Xu HHK. Stem Cells and Calcium Phosphate Cement Scaffolds for Bone Regeneration. *J. Dent. Res.* 2014a;93(7):618–25.

Wang X, Sha X-J, Li G-H, Yang F-S, Ji K, Wen L-Y, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch. Oral Biol. Elsevier Ltd*; 2012;57(9):1231–40.

Wang Y, Yin Y, Jiang F, Chen N. Human amnion mesenchymal stem cells promote proliferation and osteogenic differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Mol. Histol.* 2014b;46(140):13–20.

Warnke PH, Humpe A, Strunk D, Stephens S, Warnke F, Wiltfang J, et al. A clinically-feasible protocol for using human platelet lysate and mesenchymal stem cells in regenerative therapies. *J. Cranio-Maxillofacial Surg. Elsevier Ltd*; 2013;41(2):153–61.

Wen Y, Jiang B, Cui J, Li G, Yu M, Wang F, et al. Superior osteogenic capacity of different mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Elsevier*; 2013;116(5):e324–32.

Xiao L, Nasu M. From regenerative dentistry to regenerative medicine: progress, challenges, and potential applications of oral stem cells. *Stem Cells Cloning Adv. Appl.* 2014;7:89–99.

Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Umemura E, Hara K, Nagasaka T, et al. Injectable Bone Tissue Engineering Using Expanded Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells.* 2013 Mar;31(3):572–80.

Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. *BMC Biotechnol.* 2014;14(1):105.

Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi H, Ebine T, Niibe K, Houlihan DD, et al. Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration. *J. Dent. Res.* 2015;1–9.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 1 - Artigos excluídos da Revisão Sistemática

Referência	Nº de ensaios	Tipo de Células	<i>In vitro/in vivo</i>	Espécie de recolha/ transplantação	Região reabilitada	Critério de exclusão
Szpalski <i>et al.</i> 2012	14	MSCs	<i>In vivo</i>	Animais (R e T)	Defeito ósseo craniofacial	1, 7, 8
Lacerda-Pinheiro <i>et al.</i> 2012	1	DPSCs	<i>In vivo</i>	Animais (R e T)	Defeito ósseo mandibular	1, 7, 8
Isobe <i>et al.</i> 2015	1	DPSCs, BMSCs, SHEDs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Avaliação da atividade osteogénica, adipogénica e condrogénica	3, 6, 7
Hara <i>et al.</i> 2011	1	SHEDs, BMSCs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica e odontogénica	3, 6, 7
Wang <i>et al.</i> 2012	1	SHEDs, DPSCs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Testar aplicação terapêutica em medicina regenerativa	3, 6, 8
Bakopoulou <i>et al.</i> 2011	1	DPSCs, SCAPs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica e odontogénica	3, 6
Kawashima 2012	39	DPSCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R), Animais (R e T)	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica e odontogénica	7
Khojasteh and Sadeghi 2016	1	ASCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R e T)	Tratamento de atrofia maxilo-mandibular	8
Park <i>et al.</i> 2016	25	DPSCs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica e odontogénica	3,6

Katagiri <i>et al.</i> 2016	1	BMSCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R e T)	Regeneração alveolar	Case Report
Alvarez <i>et al.</i> 2015	1	BMSCs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica e odontogénica	3, 6, 7
Pipino and Pandolfi 2015	20	AFSCs	<i>In vivo/in vitro</i>	Animais (T)	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica	1
Jiawen <i>et al.</i> 2014	1	AFSCs, BMSCs	<i>In vivo/in vitro</i>	Não referido	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica	6, 7
Wang <i>et al.</i> 2015	1	iPSCs, UCMSCs, BMSCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R), Animais (T)	Regeneração óssea	6, 7
Yamaguchi <i>et al.</i> 2014	1	MSCs	<i>In vivo/in vitro</i>	Animais (R e T)	Regeneração óssea	1
Wang <i>et al.</i> 2014	1	AFSCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R)	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica	6, 7, 8
Jiawen <i>et al.</i> 2014	1	AESCs	<i>In vitro/in vitro</i>	Humanos (R e T)	Restaurações de defeitos alveolares	8
Choi <i>et al.</i> 2015	1	DPSCs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica e dentinogénica	3,6,7, 8
Yasui <i>et al.</i> 2015	1	DPSCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R)	Promoção de regeneração óssea	6, 7, 8
Kim <i>et al.</i> 2014	1	MSCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R), Animais (T)	Promoção de regeneração óssea	6, 7, 8
Syed-Picard <i>et al.</i> 2014	1	BMSCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R), Animais (T)	Regeneração do perióstio	6, 7

Wang <i>et al.</i> 2014	Revisão	UCMSCs, BMSCs, ESCs, iPSCs	<i>In vitro/in vitro</i>	Humanos (R), Animais (T)	Regeneração óssea	6, 7
Ma <i>et al.</i> 2014	13	DPSCs, ASCs, BMSCs	<i>In vivo</i>	Animais (R e T)	Regeneração óssea (diferentes regiões)	1
Mason <i>et al.</i> 2014	1	BMSCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R e T), Animais (T)	Regeneração óssea (tecidos crânio-faciais)	7
Liu <i>et al.</i> 2014	1	BMSCs	<i>In vivo</i>	Animais (R e T)	Formação óssea em defeitos mandibulares	1, 7
Warnke <i>et al.</i> 2013	1	MSCs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Avaliação da capacidade de diferenciação osteogénica e adipogénica	3, 6, 7, 8
Wen <i>et al.</i> 2013	1	BMSCs, ASCs, UCMSCs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Regeneração óssea (diferentes regiões)	3, 6, 7
Atari <i>et al.</i> 2012	1	DPSCs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Osteogénese	3, 6, 7, 8
Srouji <i>et al.</i> 2012	1	MSCs	<i>In vivo</i>	Humanos (R), Animais (T)	Reparação óssea cranial e de osso longo	7, 8
Miura <i>et al.</i> 2006	Revisão de estudos	BMSCs	<i>In vitro</i>	Humanos (R)	Reparação óssea crânio-facial	3, 6, 7

AFSCs= *amniotic fluid stem cells* / células estaminais do líquido amniótico

ASCs= *adult stem cells* / células estaminais adultas

BMSCs= *bone marrow stem cells* / células estaminais da medula óssea

DPSCs= *dental pulp stem cells* / células estaminais da polpa dentária

ESCs= *embryonic stem cells* / células estaminais embrionárias

iPSCs= *induced pluripotent stem cells* / células estaminais pluripotentes induzidas

MCSs= *mesenchymal stem cells* / células estaminais mesenquimatosas

SCAPs= *stem cells of the apical papilla* / células estaminais da papila apical

SHEDs= *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* / células estaminais de dentes decíduos exfoliados

UCMSCs= *umbilical cord mesenchymal stem cells* / células estaminais do cordão umbilical

R= espécie de recolha

T= espécie de transplantação

ANEXO B

CASP – Revisão sistemática - (Padial-Molina et al. 2015)

(Secção A) Os resultados da revisão são válidos?

1. O estudo apresenta uma questão direta e clara?

SIM.

A população estudada: Total de 290 humanos e 342 intervenções.

A intervenção feita/ outcome considerado: A pesquisa na base de dados foi realizada para incluir ensaios clínicos humanos (randomizados ou controlados) e relatos de casos/série. O principal objetivo desta revisão é o de identificar a literatura existente sobre estudos clínicos utilizando células estaminais mesenquimatosas (MSCs) ou células estaminais adiposas para tratar defeitos ósseos orais e analisar criticamente a sua validade, metodologia e resultados. Além disso, também serão discutidas estratégias emergentes para o recrutamento e transplante de MSCs em defeitos ósseos.

2. Os autores consultaram o tipo certo de literatura?

SIM.

Os estudos reportados nesta revisão são derivados de ensaios que recorrem ao uso de células multipotentes mesenquimais para a regeneração tecidual. Foram utilizados 9 ensaios clínicos aleatorizado controlados, 9 séries de casos e 10 relatos de casos. Devido à alta variabilidade entre as diferentes variáveis, não foi considerado apropriado a realização de uma meta-análise.

3. Todos os estudos relevantes/importantes foram incluídos?

SIM.

Uma pesquisa de bases de dados eletrónicas, incluindo Ovid (MEDLINE), PubMed e Cochrane Central foi realizada em Setembro de 2014 por dois examinadores. Esta pesquisa foi limitada a artigos publicados em Inglês durante os últimos 10 anos e realizados em seres humanos. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram as seguintes: (“*Mesenchymal Stem Cell Transplantation*” [Mesh] OU “*Adult Stem Cells*” [Mesh] OU “*Stem Cells*” [Mesh] OU “*Stem Cells Transplantation*” [Mesh] OU “*Tissue erapy*” [Mesh] OU “*Bone Marrow Transplantation*” [Mesh] OU “*Bone Marrow*” [All

Fields] OU “*stem cell therapy*” [*All Fields*] OU “*stem cell*” [*All Fields*]) AND (“*Sinus Floor Augmentation*” [*Mesh*] OU “*Bone Regeneration*” [*Mesh*] OU “*Alveolar Ridge Augmentation*” [*Mesh*] OU “*craniofacial bone regeneration*” [*All Fields*] OU “*craniofacial*” [*All Fields*] OU “*alveolar bone*” [*All Fields*] OU “*implant site development*” [*All Fields*]) AND ((*Controlled Clinical Trial* [*ptyp*] OU *Clinical Trial* [*ptyp*] OU *Randomized Controlled Trial* [*ptyp*] OU *Case Reports* [*ptyp*] OU *Comparative Study* [*ptyp*] OU *Validation Studies* [*ptyp*] OU *Evaluation Studies* [*ptyp*]) E “2004/09/12” [*PDat*]: “2014/09/12” [*PDat*] AND “*humans*” [*MeSH Terms*] AND *English* [*lang*]). Foi ainda realizada uma pesquisa manual em revistas científicas relacionadas e documentos relevantes que pudessem contribuir para o processo de recolha de informação. Os critérios de inclusão estabelecidos foram os seguintes: estudos clínicos realizados em humanos (randomizados ou controlados) e relatos de casos/série sobre a aplicação clínica de MSCs na regeneração óssea oral. Por outro lado, foram excluídos artigos se a técnica aplicada estava relacionada com a regeneração periodontal ou não diretamente associada à reconstrução de tecido ósseo. Os artigos foram primeiro rastreados por meio da análise do resumo. Daqueles que foram selecionados nesta fase, foi obtido texto integral e realizou-se um segundo rastreio. O texto completo de potenciais artigos foi revisto por dois examinadores de forma independente. A decisão final de inclusão dos artigos na revisão foi feita com acordo mútuo entre os dois examinadores. Foi ainda realizada uma revisão crítica das tecnologias relevantes para a regeneração óssea em combinação com MSCs.

4. Os autores da revisão fizeram o suficiente para garantir a qualidade dos estudos incluídos?

SIM.

Um total de 190 artigos foram identificados pela base de dados e pela procura manual e foi avaliada a sua elegibilidade. Depois da análise dos resumos, foram selecionados 51 artigos para a avaliação de texto completo. Destes, apenas 28 foram incluídos nesta revisão com base nos critérios de inclusão previamente determinados. A partir dos 28 artigos selecionados, obtiveram-se 9 ensaios clínicos randomizados controlados, 9 séries de casos e 10 relatos de casos.

5. Se os resultados da avaliação fossem combinados, seria razoável fazê-lo?

SIM.

Os resultados foram similares de estudo para estudo? Sim. Embora diferentes tecnologias e protocolos de atuação estejam a ser estudados nesta área, o tipo celular, a origem e o protocolo ideal de processamento permanecem ainda por definir. Dos 28 estudos clínicos identificados, 25 reportam o uso de aspiração de células estaminais da medula óssea do osso ilíaco demonstrando assim que este local é amplamente aceite como o local de colheita padrão. No entanto, não há padronização em termos de processamento e manuseamento do material de colheita. Outras importantes diferenças entre os estudos são o transportador celular utilizado e a variação dos defeitos ósseos tratados.

As razões para quaisquer variações nos resultados são discutidas? Sim. A análise da literatura publicada sobre o uso clínico de MSCs para regeneração óssea oral prévia à colocação de implantes destaca a escassez de ensaios clínicos randomizados adequados e com metodologias comparáveis para que seja possível extrair conclusões globais.

(Secção B) Quais são os resultados?

6. Quais são os resultados globais da revisão?

Globalmente, os resultados na maior parte da literatura disponível mostram a eficácia da técnica por apreciações qualitativas e alguns estudos falham por não apresentar dados quantitativos e objetivos. Quando o fazem, os dados reportados não são comparáveis variando de medidas verticais, horizontais ou volumétricas. Por outro lado, o número de diferenças entre os estudos clínicos utilizados torna difícil estabelecer uma comparação global justa. Apenas 2 dos ensaios clínicos randomizados são razoavelmente comparáveis, uma vez que usam metodologias semelhantes para o processo de concentração (*chairside*), origem celular (crista ilíaca), tipo de defeito (elevação do seio) e grupo de controlo (osso bovino + enxerto autógeno). De ambos os estudos, que globalmente trataram 69 cavidades (46 testes e 23 controlos) em 38 pacientes, pode-se concluir que a combinação de osso bovino com células aspiradas da medula óssea fornece um ganho de volume radiográfico mais elevado ($1,74 \pm 0,69$) quando comparado com o controlo ($1,33 \pm 0,62$ ml). As principais conclusões da revisão foram que a aplicação clínica de células estaminais para regeneração óssea por via oral promove melhores resultados em termos clínicos, radiográficos e histológicos. No entanto, a significância clínica das aplicações referidas nestes ensaios clínicos aleatorizados (principalmente defeitos auto-limitados, como regiões pós-extracronais e elevações do seio maxilar) é muito limitada.

Como foram os resultados expressos (NNT, odds ratio etc.)? As medidas são apresentadas como grandezas absolutas ou % de ganho ou redução dependendo do estudo.

7. Quão precisos são os resultados?

Quais os intervalos de confiança? A percentagem média ponderada de osso vital obtida nos estudos avaliados ($18,02 \pm 9,1$) não é estaticamente diferente do grupo de controlo ($9,14 \pm 7,02$), ($p = 0,085$, *t de Student*).

(Secção C) Os resultados ajudam localmente?

8. Os resultados podem ser aplicados à população local?

NÃO REFERIDO.

Os pacientes abrangidos pela revisão serão suficientemente diferentes da população local para causar preocupação? Não. Contudo, apesar da revisão apresentar uma amostra considerável, uma descrição detalhada da população não é fornecida não sendo possível afirmar que os resultados possam ser aplicados à população local.

9. Todos os *outcomes* importantes foram considerados?

SIM.

Espessura clínica e radiográfica de tecido ósseo alveolar, altura óssea linear, nível ósseo horizontal e vertical, nível de trabeculação óssea, encerramento eficaz de fístula oro-nasal, eficaz regeneração óssea para colocação de implantes, reabilitação protética e consolidação de fratura mandibular.

Haveria alguma outra informação que fosse importante referir? As vantagens do uso de células estaminais para regeneração óssea necessitam ainda de ser estudadas em cenários mais difíceis, como em casos de defeitos ósseos extensos e não localizados onde possam mostrar o seu potencial em comparação com as opções de tratamento atuais.

10. Os benefícios compensam os prejuízos e os gastos?

SIM.

A regeneração óssea com base em abordagens de engenharia tecidual tem uma base sólida para aplicação clínica em defeitos ósseos humanos. No entanto, algumas destas terapias ainda estão no nível pré-clínico. A literatura publicada na aplicação clínica de células estaminais para a regeneração óssea craniofacial é abundante, mas altamente

diversificada, o que reflete o facto de estas tecnologias serem relativamente recentes sendo difícil padronizar descobertas e aplicações clínicas; o número de potenciais diferentes aplicações para usar com sucesso a terapia celular na prática clínica é alto, contudo ainda precisa de comprovação científica.

Pode dizer-se que a utilização de células estaminais não é necessária em pequenos defeitos que podem ser tratados com sucesso por outros meios e a falta de vantagens conclusivas não ultrapassa as dúvidas científicas, morbilidade e potenciais complicações que a terapia com células estaminais possa apresentar. Por conseguinte, a generalização para o uso de terapia celular na prática clínica diária necessita ainda de confirmação e provavelmente não é recomendada para muitos casos clínicos.

ANEXO C

CASP – Estudo Coorte - (Yamada et al. 2013)

(Secção A) Os resultados do estudo clínico são válidos?

1. O estudo apresenta uma questão direta e clara?

SIM.

Desenvolveu-se uma abordagem para a promoção de regeneração óssea utilizando precursores de tecidos ósseos (TEB) injetáveis, compostos por células ósseas cultivadas e derivadas de células estaminais da medula óssea em conjunto com plasma rico em plaquetas (PRP) com boa plasticidade.

A população estudada: Os estudos foram realizados em animais e, posteriormente, foram realizados testes piloto em pacientes com follow-up a longo prazo. Os precursores de tecidos ósseos injetáveis foram utilizados em 104 casos clínicos com idades compreendidas entre os 19 e os 78 anos (idade média: 57,7 anos).

Os *outcomes* considerados: Foi investigado se o tratamento com células estaminais mesenquimatosas (MSCs) injetáveis juntamente com plasma rico em plaquetas tem a capacidade de regenerar osso funcional em deficiências alveolares.

É claro se o estudo tenta detetar um efeito benéfico ou prejudicial? Comprovou-se o efeito benéfico das células estaminais da medula óssea e a capacidade de gerar osteoblastos, que contribuem para a regeneração óssea, o que resultou na melhoria da função mastigatória.

2. O estudo coorte foi desenvolvido de forma aceitável?

SIM.

O coorte é representativo de uma população definida? 104 casos clínicos com idades compreendidas entre os 19 e os 78 anos (idade média: 57,7 anos). 36 casos de regeneração óssea guiada; 39 casos de elevação do seio maxilar; 12 casos de preservação do alvéolo pós-extracional e 17 casos de regeneração periodontal.

3. A exposição foi avaliada de forma precisa para minimizar o viés?

SIM.

Foi avaliada de forma objetiva ou subjetiva? De forma objetiva. A exposição foi avaliada relativamente aos níveis de reabsorção óssea pré-tratamento.

Todos os pacientes foram classificados em grupos para avaliação utilizando o mesmo

procedimento? Nos casos de regeneração óssea guiada o TEB foi transplantado para a área de reabsorção óssea. A área enxertada foi depois coberta com uma membrana não reabsorvível de politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), a fim de proteger contra a compressão do retalho. Nos casos de elevação do pavimento do seio maxilar o TEB foi injetado na cavidade do seio. Nos casos de preservação do alvéolo pós-extracional, a extração de dentes foi realizada usando uma técnica traumática cuidadosa. O alvéolo foi curetado para remover possível patologia residual e tecido de granulação e posteriormente foi colocado o TEB. Após o transplante de TEB, foi novamente utilizada uma membrana não reabsorvível para proteção. Nos casos de periodontite, a cirurgia periodontal consistiu na abertura de um retalho tradicional e injeção de TEB. Os retalhos vestibular e palatino (espessura total) foram elevados para expor o osso subjacente e as raízes dos dentes envolvidos. O TEB foi injetado no defeito ósseo adjacente à superfície da raiz após o desbridamento meticuloso a fim de remover os depósitos bacterianos e tecidos inflamados. Os pacientes receberam antibióticos juntamente com analgésicos conforme necessário.

4. O resultado foi medido com precisão para minimizar o viés?

SIM.

Os resultados foram avaliados de forma subjetiva ou objetiva? Todas as análises estatísticas foram realizadas com SPSS. Foi comparada a existência de áreas ósseas recém-formadas, a viabilidade celular, e o valor CT com o one-way ANOVA e testes de diferença post-hoc menos significativos. Para o índice periodontal foi utilizado o teste t pareado. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado como significativo. O progresso da regeneração óssea é avaliado maioritariamente com base em alterações radiográficas e em imagens de tomografia computadorizada o que nos fornece o melhor método radiológico para proceder à análise morfológica e qualitativa do tecido ósseo na região regenerada facilitando assim a avaliação da densidade óssea.

Foi estabelecido um sistema confiável para detetar todos os casos (para medir a ocorrência de doença)? Após exames orais e físicos de rotina, os pacientes saudáveis foram selecionados. Os pacientes com problemas convencionais da função mastigatória devido a grave atrofia do rebordo alveolar foram elegíveis para inclusão.

Os métodos de avaliação de resultados foram similares para os diferentes grupos? Os resultados sofreram uma avaliação radiográfica, histológica, e densitométrica por meio de tomografia computadorizada para os casos de regeneração óssea guiada, elevação do

pavimento do seio e preservação alveolar. Nos casos de tratamento periodontal a eficácia da aplicação de TEB foi avaliada de acordo com a melhoria dos parâmetros clínicos: profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e ganho de ósseo. A sua utilização não só permite que o tratamento seja planeado de forma adequada, mas também facilita a monitorização longitudinal, de modo que a resposta ao tratamento possa ser avaliada e locais de possível progressão da doença possam ser identificados.

5. a. Os autores identificaram todos os possíveis fatores de confusão? Listar os que possam faltar.

b. Tiveram em conta dos possíveis fatores de confusão no design do estudo ou durante a análise?

NÃO É POSSÍVEL AFIRMAR.

6. a. O follow up dos pacientes foi suficientemente completo?

SIM.

Para os casos de regeneração óssea guiada, elevação do pavimento do seio e preservação do alvéolo foi feita uma avaliação dos resultados aos 3, 6, 48 e 60 meses. Para o tratamento de patologia periodontal o follow-up realizado foi feito aos 3 e aos 6 meses e posteriormente após 1 e 5 anos.

b. O follow-up dos pacientes foi longo o suficiente?

O follow-up máximo das quatro diferentes situações de tratamento foi de 5 anos. De acordo com os resultados apresentados na ultima avaliação comprovou-se uma eficácia elevada em todos os tratamentos o que nos permite considerar o follow-up longo o suficiente.

(Secção B) Quais são os resultados?

7. Quais são os resultados do estudo?

Para os casos de regeneração óssea guiada (ROG), elevação do pavimento do seio (EPS) e preservação do alvéolo pós-extracional (PA) as radiografias mostraram claramente que o defeito ósseo foi preenchido com osso recém-formado após injeção de TEB, e pouca reabsorção ocorreu durante o período de follow-up. Observações histológicas de amostras das biopsias indicam a presença de tecido ósseo recém-formado. Os resultados densitométricos médios (tomografia computadorizada, valor TC) de osso regenerado por

TEB (ROG= 309.1, 381.0; EPS= 354.3, 455.4 aos 3 e 6 meses, respectivamente e PA= 388.0 unidades Hounsfield em 3 meses) foram maiores do que a linha de base pré-operatória ($p < 0,001$). Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa na densidade óssea entre a linha de base e todos os pontos de tempo após a operação ($p < 0,001$). Os resultados foram equivalentes aos do osso nativo no follow-up de 6 meses para a ROG e para EPS, e aos 3 meses para os casos de PA. Nenhuma redução significativa foi encontrada até aos 48 meses em ROG e aos 60 meses nos casos de EPS. Além disso, todos os implantes dentários colocados na região regenerada estavam funcionais e a taxa de sucesso foi de 100%. O tratamento periodontal foi associado a uma melhoria nas variáveis clínicas após aplicação de TEB. Para determinar o grau de doença periodontal, avaliou-se a profundidade de sondagem, o nível de inserção clínica, e o ganho de osso. A redução média da profundidade de sondagem, o ganho no nível clínico de inserção, e o ganho de osso foi de 5.12, 4.29, e 3.12 mm, respectivamente. A profundidade de sondagem periodontal, o nível de inserção clínica, e a altura óssea linear apresentaram melhorias significativas em comparação com os níveis basais ($p < 0,001$). A formação de osso foi confirmada por observação radiográfica, que mostrou claramente que o osso em torno do dente tinha regenerado e que pouca reabsorção foi observada durante o período de follow-up. O tecido regenerado mostrou dureza semelhante ao osso primitivo. O exame histológico das amostras clínicas da biópsia do TEB mostraram nova formação óssea com um padrão lamelar, uma cavidade medular bem delimitada e abundante vascularização. Coloração imunohistoquímica revelou-se positiva para a osteocalcina no interior do tecido mineralizado recém-formado em secções de TEB e no osso primitivo. A análise histomorfométrica indicou que as áreas ósseas recém-formados pelo TEB eram semelhantes com as do osso primitivo. Não houve diferenças significativas entre o TEB e o grupo de controlo (osso primitivo).

8. Quão precisos são os resultados (intervalos de confiança)?

Todas as análises estatísticas foram realizadas com SPSS. Foi comparada a existência de áreas ósseas recém-formadas, viabilidade celular, e valores de tomografia computadorizada com o one-way ANOVA e testes de diferença post-hoc menos significativos. Para o índice periodontal foi utilizado o teste t pareado. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado como significativo. Os resultados densitométricos médios (tomografia computadorizada, valor TC) de osso regenerado por TEB foram maiores do que a linha de base pré-operatória ($p < 0,001$). Foi encontrada uma diferença estatisticamente

significativa na densidade óssea entre a linha de base e todos os pontos de tempo após a operação ($p < 0,001$). A profundidade de sondagem periodontal, o nível de inserção clínica, e a altura óssea linear apresentaram melhorias significativas em comparação com os níveis basais ($p < 0,001$).

(Secção C) Os resultados ajudam localmente?

9. Acredita nos resultados?

SIM.

Os resultados permitem concluir que as células estaminais derivadas da medula óssea têm a capacidade de funcionar como células estaminais osteoblastogénicas. As terapias regenerativas ósseas tendo por base o transplante de células estaminais mesenquimatosas são altamente eficazes e reduzem as complicações associadas ao acelerar a formação óssea e ao permitir a manutenção de uma boa qualidade funcional. O fato da utilização destas células para fins terapêuticos apresentar resultados seguros, eficazes e de longa duração permite-nos inferir sobre a credibilidade do estudo.

10. Os resultados podem ser aplicados à população local?

NÃO REFERIDO.

Apesar de amostra utilizada ser significativa, não podemos afirmar que seja possível aplicar os resultados obtidos à população local uma vez que não existe uma descrição detalhada da população avaliada.

É possível quantificar os prejuízos e os benefícios locais? De acordo com os resultados referidos após follow-up de 5 anos não foi identificada qualquer diminuição de densidade óssea, e a densidade dos enxertos permaneceu quase ao mesmo nível durante 4 e 5 anos após ROG e EPS, respetivamente. Nenhuma falha de implantes dentários foi relatada durante o período de follow-up.

11. Será que os resultados deste estudo se encaixam com outras evidências disponíveis?

SIM.

Estudos subsequentes demonstraram a capacidade de regeneração óssea das células estaminais da medula óssea (BMSCs) expandidas *in vitro* e *in situ* quando implantadas em vários modelos animais que apresentavam defeitos ósseos segmentais críticos. Estes

resultados levaram à aprovação de ensaios clínicos para a implantação de compostos de BMSCs para o tratamento de grandes defeitos ósseos em humanos. Os resultados são consistentes com estudos anteriores que indicam que as BMSCs podem ser dirigidas para diferenciação osteogénica. Por outro lado, a formação óssea com base numa matriz de plasma rico em plaquetas isolada (sem células) apresentava alguma melhoria, mas menos do que a matriz contendo BMSCs. Um estudo prévio onde as células estaminais mesenquimatosas (MSCs) foram aplicadas para a distração osteogénica de ossos longos também relata que a taxa de complicações foi significativamente menor no grupo que recorreu à utilização de MSCs, em comparação com o grupo de controlo (sem terapia celular). Além disso, os relatórios de casos utilizando MSCs para o tratamento de doentes com condições tais como tumores ósseos, osteoartrite, lesão da medula espinal demonstraram que não existem reações adversas evidentes durante o período pós-operatório. Estes estudos foram consistentes com os resultados clínicos obtidos mostrando que nenhum dos pacientes apresentou efeitos colaterais clínicos secundários.

12. Quais são as implicações deste estudo na prática clínica?

Um estudo observacional raramente fornece evidências suficientes para permitir mudanças na prática clínica ou na tomada de decisões. Recomendações de estudos de observação são sempre mais fortes quando apoiada por outros elementos de prova: Para superar os defeitos dos materiais de enxerto ósseo atualmente utilizados (enxertos e próteses sintéticas), a regeneração óssea com base na terapia celular utilizando a engenharia de tecidos proporciona uma técnica promissora, com mínima capacidade de invasão. No entanto, pouco se conhece sobre a função das BMSCs no uso clínico. Neste estudo, a principal conclusão clínica foi que as células transplantadas contribuem para o processo de formação óssea *in vivo*. Os resultados também indicaram a participação direta de BMSCs na osteogénese; as células podem ser submetidas a uma diferenciação gradual em direção a uma linhagem osteoblástica e contribuir assim para a melhoria das propriedades biomecânicas *in vivo*. Quando em conjunto, as terapias regenerativas ósseas juntamente com o transplante de MSCs são altamente eficazes e permitem reduzir as complicações associadas ao acelerar a formação óssea e garantir a manutenção de boa qualidade funcional. Concluímos que as BMSCs podem ser segura e eficazmente utilizadas como agentes terapêuticos com comprovação de melhorias a longo prazo. Estas melhorias na estrutura e função do osso provavelmente refletem a atividade das células estaminais, e o osso regenerado apresenta-se semelhante ao primitivo mantendo a sua

função. A atividade terapêutica no enxerto de MSCs em pacientes com defeitos ósseos indica que o transplante de TEB pode também ser viável para outras doenças, como casos fusão espinhal, necessidade de aumento da consolidação da fratura, e reconstrução de vários defeitos ósseos.

ANEXO D

CASP – Estudo clínico randomizado - (Kaigler et al. 2013)

(Secção A) Os resultados do estudo clínico são válidos?

1. O estudo apresenta uma questão direta e clara?

SIM.

A população estudada: 24 pacientes com necessidade de uma exodontia dentária foram recrutados para a participação na fase I e II do estudo. Indivíduos do género feminino e masculino, com idades compreendidas entre os 20 e os 70 anos foram incluídos no estudo se capazes e dispostos a ler, compreender e assinar o consentimento informado. Nenhuma análise estatística foi realizada para determinar o tamanho da amostra, em vez disso o número de participantes foi escolhido, tendo em conta a viabilidade em vez da precisão estatística.

A intervenção feita: Utilização de BMSCs para a regeneração de tecido ósseo craniofacial. Células regeneradoras teciduais (CRTs) foram transplantadas nos defeitos ósseos mandibulares e biópsias ósseas foram recolhidas para análise às 6 e às 12 semanas. A reconstrução destas regiões ficou completa após reabilitação com implantes (follow-up de 12 meses).

O termo de comparação cedido: Este estudo compara a utilização de uma terapia celular inovadora (suspensão gelatinosa de BMSCs) com um procedimento de regeneração óssea guiada (ROG) para o tratamento de defeitos mandibulares localizados.

Os outcomes considerados: A terapia celular com base em células reparadoras tecidulares será segura e eficaz na regeneração de defeitos craniofaciais localizados.

2. A distribuição de pacientes foi feita de forma randomizada?

SIM.

Como foi feita a randomização? 24 defeitos ósseos, de 24 pacientes, foram avaliados para regeneração óssea. Metade (12) dos pacientes foram escolhidos de forma aleatória para receber terapia com CRTs e a outra metade recebeu uma terapia de regeneração óssea guiada. Posteriormente, os participantes foram distribuídos dentro de cada grupo de tratamento para 6 ou 12 semanas de colheita e avaliação óssea. Assim, seis pacientes foram atribuídos a um dos quatro possíveis grupos (tipo de tratamento cruzado com tempo de avaliação dos resultados). Os pacientes foram distribuídos aleatoriamente em quatro

blocos recorrendo a um calendário de aleatorização gerado por computador, sendo um paciente de cada bloco atribuído a um dos quatro grupos referidos anteriormente. Os pacientes atribuídos ao grupo de avaliação de resultados de 12 semanas não foram autorizados a cruzarem-se com o grupo de avaliação às 6 semanas.

A randomização foi ocultada dos investigadores? A distribuição de tratamentos foi cega para os examinadores dos resultados primários (avaliação radiográfica, tomografia micro-computadorizada, avaliação histológica e avaliações bioquímicas).

3. Os pacientes, profissionais de saúde, e restantes pessoas envolvidas no estudo estavam “cegas”?

SIM.

Tendo em conta que o grupo de CRTs exigia a aspiração de medula óssea autóloga, a manutenção de um estudo duplamente cego (paciente e cirurgião) não foi possível. No entanto, a distribuição de tratamentos foi cega para os examinadores dos resultados primários (avaliação radiográfica, tomografia micro-computadorizada, avaliação histológica e avaliações bioquímicas). Os pacientes atribuídos ao grupo de avaliação de resultados de 12 semanas não foram autorizados a cruzarem-se com o grupo de avaliação às 6 semanas.

4. Os grupos eram semelhantes no início do estudo?

SIM.

Indivíduos do género feminino e masculino, com idades compreendidas entre os 20 e os 70 anos foram incluídos no estudo se capazes e dispostos a ler, compreender e assinar o consentimento informado. Os pacientes foram excluídos do estudo se apresentavam uma das seguintes condições: discrasia sanguínea, doenças infecciosas ativas, disfunção renal ou hepática, distúrbios endócrinos, cancro, história ou uso corrente de bisfosfonatos, doença óssea metabólica, VIH positivo, gravidez, fumador atual, menos de 2 milímetros de osso a partir do ápex do dente a ser extraído para o pavimento do seio maxilar, menos de 4 mm de osso a partir do ápex do dente a ser extraído para a crista do osso alveolar.

5. Não tendo em conta a intervenção experimental, os grupos foram tratados de igual forma?

SIM.

Para os 24 pacientes seleccionados para participar neste estudo, foi realizada a extração de

um dente não restaurável e a sua remoção resultou numa área de defeito ósseo localizada.

6. Todos os pacientes que entraram no estudo clínico foram contemplados na sua conclusão?

SIM.

Ao longo do estudo, não ocorreram eventos adversos graves que tenham sido relatados durante o exame de avaliação. Um paciente foi perdido para follow-up e não compareceu para as duas visitas finais (após a restauração).

Os pacientes foram analisados nos grupos em que foram anteriormente distribuídos? A fim de se obter um total de 12 pacientes nos grupos de CRT (seis para follow-up às 6 semanas e seis às 12 semanas), foi necessário um total de 16 participantes para serem distribuídos porque não foi possível proceder à aspiração de medula óssea de quatro pacientes devido ao elevado índice de massa corporal (IMC) valores (> 25). Isto exigiu uma alteração do protocolo, a partir deste ponto, excluindo a participação no estudo de pacientes com necessidade de aspiração da medula óssea com um $IMC > 25$.

(Secção B) Quais são os resultados?

7. Quão grande foi o efeito do tratamento?

Quais os *outcomes* tidos em conta? Volume, altura e densidade óssea (medidos durante as biópsias ósseas) para colocação de implantes, percentagem de exposição implantar e necessidade de transplante ósseo adicional. Relação área óssea e área tecidual através da avaliação da atividade da fosfatase alcalina e análise de mineralização *Von Kossa* (para detetar a formação de matriz mineralizada indicativa de diferenciação osteogénica).

O *outcome* primário está claramente especificado? Uma abordagem tendo por base uma terapia celular utilizando CRTs será segura e eficaz na regeneração de defeitos ósseos craniofaciais localizadas.

Quais os resultados para cada *outcome*? Às 6 semanas, comprovou-se maior altura óssea radiográfica no grupo de CRTs do que no grupo de ROG ($p = 0,01$). Ao fim de 12 semanas, o grupo de ROG exibiu um preenchimento ósseo de $74,6 \pm 3,3\%$, enquanto os grupos de CRTs mostraram um preenchimento de $80,1 \pm 2,0\%$ ($p = 0,28$). Clinicamente, nos sítios tratados com ROG, os tecidos regenerados em 6 semanas apresentaram grande desenvolvimento vascular e fibroso. No geral, os tecidos regenerados nos locais com CRTs exibiram uma aparência clinicamente semelhante ao tecido ósseo primitivo,

demonstrando maior densidade e alta vascularização no local de colheita para biópsia óssea. Para permitir a reentrada nos locais sujeitos a cada uma das terapias de regeneração, avaliações clínicas foram realizadas para determinar se haveria necessidade de enxerto ósseo adicional para posterior terapia com implantes. A decisão de realizar o enxerto adicional foi tomada tendo em conta um dos dois cenários possíveis: 1) persistência de defeitos ósseos residuais após o tratamento inicial ou 2) deficiências ósseas (ou seja, deiscências ou fenestrações) durante a colocação do implante. Nos quatro grupos, os implantes foram colocados de forma estável e nos locais previstos. No entanto, devido ao maior número de defeitos ósseos residuais presentes nos grupos tratados inicialmente com ROG, estes apresentaram uma maior necessidade (6 e 12 semanas) para receber procedimentos de enxerto ósseo adicionais no momento da colocação do implante, em relação aos grupos tratados com CRTs. Além disso, os grupos de ROG às 6 e 12 semanas, apresentaram uma exposição implantar seis vezes maior conduzindo a uma maior necessidade de enxerto secundário, em comparação com os grupos de CRTs ($p < 0,04$). Apesar de diferentes comprimentos e diâmetros, de implantes, os tamanhos utilizados eram bastante semelhantes. Todos os grupos, posteriormente aos procedimentos regenerativos, apresentaram evidência clínica de integração do implante no osso regenerado e foram capazes de suportar a carga biomecânica quando restaurados 6 meses após a colocação. A estabilidade do implante foi seguida durante um 1 ano, e todos os implantes permaneceram funcionalmente integrados no final do estudo. As biópsias ósseas a partir dos locais de regeneração foram analisadas 6 e 12 semanas após o tratamento usando μ CT tridimensional e histomorfometria. A fração de volume ósseo (FVO) e a densidade mineral óssea (DMO) foram os *outcomes* primários tidos em conta pela μ CT. A análise às 6 semanas mostrou que o FVO para o grupo ROG foi de $13 \pm 6\%$, em comparação com $28 \pm 8\%$ para o grupo de CRTs ($p = 0,08$). Da mesma forma, nas comparações de resultados da DMO entre ROG e os grupos tratados com CRTs, o ultimo grupo apresentou uma DMO duas vezes maior ($195,0 \pm 63,3$ mg/cc) no osso regenerado do que o grupo da ROG ($85 \pm 46,3$ mg/cc); ($p = 0,1$). Após análise micro-CT, as biópsias ósseas foram avaliadas histomorfometricamente. Quando visualizados sob microscopia de luz, a maioria das amostras apresentavam uma constituição rica num tecido conjuntivo altamente celular e denso, com abundante número de vasos sanguíneos, havia ainda diferença às 6 semanas entre as amostras colhidas a partir dos locais tratados com CRTs e com ROG existindo maior percentagem óssea no primeiro. Após a análise de 6 e 12 semanas, não houve diferenças estatisticamente significativas nas percentagens de área

óssea/área tecidual (AO/AT). Às 6 semanas, o tecido regenerado a partir de ROG tinha uma relação AO/AT de $19,6 \pm 4,2\%$, enquanto que o tecido ósseo regenerado do grupo tratado com CRTs tinha um AO/AT de $28,8 \pm 9,1\%$ ($p = 0,10$ entre os grupos). Às 12 semanas, a percentagem de tecido ósseo regenerado pareceu ser semelhante entre os 2 grupos (ROG e CRTs) com percentagens de AO/AT $35,1 \pm 3,2\%$ e $35,2 \pm 8,9\%$, respetivamente. Como uma análise *ad hoc* do potencial osteogénico *in vitro* (atividade da fosfatase alcalina) e mineralização (*Von Kossa*) a capacidade regenerativa das CRTs foi correlacionada com os resultados clínicos de DMO e FVO para cada um dos grupos de tratamento com CRTs. Estes dados demonstram que houve uma correlação positiva entre a atividade da fosfatase alcalina e a FVO ($r = 0,56$, $p = 0,058$) e correlação positiva estatisticamente significativa entre a atividade da fosfatase alcalina e a DMO ($r = 0,58$; $p = 0,049$). Correlações positivas com a capacidade de mineralização *in vitro* e as medidas de DMO e FVO não foram estatisticamente significativas.

8. Quão precisa é a estimativa de efeito do tratamento?

Quais os limites de confiança? Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão e intervalos de 95% de confiança (IC) para as diferenças médias entre os grupos (ROG e CRT); diferenças de médias entre os grupos de tratamento foram avaliados com um teste t de duas amostras. A correlação teve por base o coeficiente de correlação produto-momento de Pearson (r), com significância baseada na transformação Z de Fisher.

Os limites de confiança foram estatisticamente significativos? As análises de segurança foram realizadas em cada patamar do estudo e incluíram a notificação de eventos adversos avaliados pelo investigador. A análise estatística foi realizada com o software estatístico R (Fundação R para a estatística Computacional, Viena, Áustria). A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

(Secção C) Os resultados ajudam localmente?

9. Os resultados podem ser aplicados neste contexto? (ou para a população local?)

NÃO É POSSÍVEL AFIRMAR.

Não podemos afirmar que seja possível aplicar os resultados obtidos à população local uma vez que não existe uma descrição detalhada da população avaliada.

10. Todos os *outcomes* clínicos relevantes foram considerados?

SIM.

A necessidade deste estudo clínico foi claramente descrita? Embora os tratamentos atuais forneçam restaurações funcionais e estruturais dos tecidos afetados, a maioria das abordagens não cumpre os conceitos emergentes de tratamentos com resultados mais biológicos. Novas estratégias à base de células e tecidos para promoção de regeneração óssea precisam de desenvolvimento para superar as limitações dos tratamentos tradicionais usando transplantes alogênicos e substitutos sintéticos para reconstrução craniofacial.

11. Os benefícios compensam os prejuízos e os gastos?

SIM.

Em comparação com estudos cujo tratamento incluía a utilização de transplantes autólogos ou mesmo em comparação com os resultados obtidos no tratamento com regeneração óssea guiada (tratamento convencional) a utilização de CRTs para regeneração óssea apresenta resultados imediatos e a longo prazo significativamente superiores. Relativamente a gastos ou possíveis prejuízos, estes advêm da dificuldade de recolha de células mesenquimatosas derivadas da medula óssea, contudo não são preponderantes aos benefícios quando comparados com a morbilidade do local dador numa situação de enxertos ósseos autólogos.

ANEXO E

CASP – Revisão sistemática - (Maria et al. 2007)

(Secção A) Os resultados da revisão são válidos?

1. O estudo apresenta uma questão direta e clara?

SIM.

A população estudada: paciente com grande ressecção na mandíbula (da região paramediana esquerda para a região retromolar direita).

A intervenção feita/ outcome considerado: O objetivo desta revisão é o de avaliar artigos recentes de células estaminais da medula óssea que têm a capacidade de se evolver ou diferenciar em tecidos orais ou craniofaciais e a sua aplicação clínica na regeneração de tecidos orais.

2. Os autores consultaram o tipo certo de literatura?

SIM.

Os estudos reportados nesta revisão são derivados de ensaios que recorrem ao uso de células multipotentes mesenquimais para a regeneração tecidual.

3. Todos os estudos relevantes/importantes foram incluídos?

NÃO REFERIDO.

4. Os autores da revisão fizeram o suficiente para garantir a qualidade dos estudos incluídos?

NÃO REFERIDO.

5. Se os resultados da avaliação fossem combinados, seria razoável fazê-lo?

SIM.

Os resultados foram similares de estudo para estudo? Sim, os resultados apresentados para a regeneração de tecidos da região craniofacial comprovam a eficácia das células estaminais da medula óssea em tecidos como: ligamento periodontal, cimento, osso, côndilo, dente e mucosa oral.

Os resultados dos estudos incluídos são claramente apresentados? Sim. A divisão de

apresentação de resultados é feita consoante a área regenerada. Para cada região são apresentados e descritos os estudos avaliados e respetivos resultados.

(Secção B) Quais são os resultados?

6. Quais são os resultados globais da revisão?

A cintigrafia óssea mostrou remodelação e mineralização óssea na região do transplante mandibular ambos antes e depois da realização do transplante. A tomografia computadorizada forneceu evidência de formação de novo tecido ósseo. Sete semanas após o transplante, o mesmo foi retirado com uma parte adjacente do músculo grande dorsal (contém a artéria e veia toracodorsal que haviam fornecido irrigação) e transplantados para reparar o defeito mandibular. O paciente teve um grau melhorado de mastigação e ficou satisfeito com o resultado estético. Os resultados globais da revisão mostram que a plasticidade das células estaminais adultas continua a ser controversa e uma pesquisa mais aprofundada é necessária antes de poder implementar de forma segura este tipo de terapias regenerativas na prática clínica. (Tendo em conta que só nos interessam estudos de regeneração óssea em humanos).

7. Quão precisos são os resultados?

NÃO REFERIDO.

(Secção C) Os resultados ajudam localmente?

8. Os resultados podem ser aplicados à população local?

NÃO REFERIDO.

Os pacientes abrangidos pela revisão serão suficientemente diferentes da população local para causar preocupação? De todos os estudos avaliados, apenas 3 foram realizados em humanos não nos fornecendo assim uma amostra suficiente para afirmar que os resultados possam ser aplicados à população local.

9. Todos os *outcomes* importantes foram considerados?

NÃO.

Haveria alguma outra informação que fosse importante referir? Seria de máxima importância a referência de valores de densidade, altura e volume ósseo antes e após o tratamento para que fosse possível estabelecer uma comparação. Para além disso, deveria estar referido o período de follow-up dos estudos e resultados a longo prazo.

10. Os benefícios compensam os prejuízos e os gastos?

SIM.

Os enxertos ósseos autólogos têm sido o “Gold Standard” na reconstrução craniofacial. No entanto, a morbilidade da região dadora e uma quantidade/oferta limitada ainda são obstáculos substanciais para este método. O desenvolvimento da engenharia de tecido ósseo pode substituir totalmente tecidos ósseos perdidos através do uso de matrizes biodegradáveis que permitem o transporte de células progenitoras ósseas e agentes bioativos. Foi reportado nesta revisão o sucesso e eficácia da regeneração de tecidos na região craniofacial, não havendo referência a prejuízos ou gastos. Conclui-se, que apesar da eficácia relatada nos estudos a engenharia tecidual continua a ser controversa e uma pesquisa mais aprofundada é necessária antes de poder implementar de forma segura este tipo de terapias regenerativas na prática clínica.